

BEST AVAILABLE COPY

PCT/JP 2004/015620

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

07.12.2004

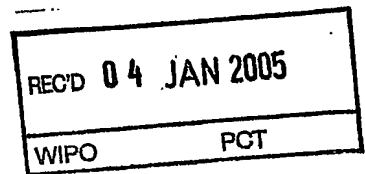
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 4 年 5 月 1 3 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 4 - 1 4 3 4 2 1
Application Number:
[ST. 10/C] : [J P 2 0 0 4 - 1 4 3 4 2 1]

出 願 人 帝 人 フ ァ ー マ 株 式 会 社
Applicant(s):

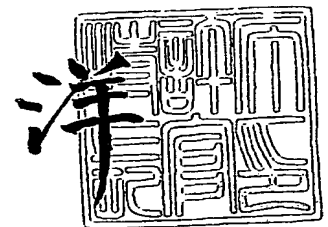


PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年 1 1 月 2 2 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 1 0 5 7 1 0

【書類名】 特許願
【整理番号】 P37777
【提出日】 平成16年 5月13日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/02
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人ファーマ株式会社 東京研究センター内
 【氏名】 山名 慶
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人ファーマ株式会社 東京研究センター内
 【氏名】 中山 保典
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人ファーマ株式会社 東京研究センター内
 【氏名】 高橋 良昌
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人ファーマ株式会社 東京研究センター内
 【氏名】 落合 鋭士
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都千代田区内幸町2丁目1番1号 帝人ファーマ株式会社内
 【氏名】 和田 仁
【発明者】
 【住所又は居所】 東京都日野市旭が丘4丁目3番2号 帝人ファーマ株式会社 東京研究センター内
 【氏名】 東 由明
【特許出願人】
 【識別番号】 503369495
 【氏名又は名称】 帝人ファーマ株式会社
【代理人】
 【識別番号】 100099678
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 三原 秀子
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 206048
 【納付金額】 16,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1
 【包括委任状番号】 0400298

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を持つポリペプチド。

【請求項 2】

C h M 1 L 活性を有し、かつ、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列の 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を有することを特徴とするポリペプチド。

【請求項 3】

C h M 1 L 活性を有し、かつ、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 7 0 % 以上の相同性を持つアミノ酸配列を有することを特徴とするポリペプチド。

【請求項 4】

配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を持つポリペプチドの N 末端及び／又は C 末端に任意のアミノ酸若しくはポリペプチドが付加したポリペプチド。

【請求項 5】

該 N 末端に付加したアミノ酸若しくはポリペプチドが、メチオニンもしくはその N 末端にメチオニン残基を持つポリペプチドであることを特徴とする請求項 4 記載のポリペプチド。

【請求項 6】

該 N 末端及び／又は C 末端に付加した任意のアミノ酸若しくはポリペプチドが、連続した 6 から 8 個のヒスチジン残基を含む形のアミノ酸配列を持つポリペプチドであることを特徴とする、請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 7】

該 N 末端及び／又は C 末端に付加した任意のアミノ酸若しくはポリペプチドが、FLAG タグ配列を含む形のアミノ酸配列を持つポリペプチドであることを特徴とする、請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 8】

該 N 末端及び／又は C 末端に付加した任意のアミノ酸若しくはポリペプチドが、オワンクラゲ由来蛍光タンパク質およびその類縁体のアミノ酸配列を持つポリペプチドであることを特徴とする、請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 9】

該 N 末端及び／又は C 末端に付加した任意のアミノ酸若しくはポリペプチドが、分泌型アルカリフォスファターゼおよびその類縁体のアミノ酸配列を持つポリペプチドであることを特徴とする、請求項 4 に記載のポリペプチド。

【請求項 1 0】

配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を持つポリペプチドの N 末端に、遺伝子情報によってコードされていない酵素的もしくは化学的に修飾された残基、または、その N 末端に遺伝子情報によってコードされていない酵素的もしくは化学的に修飾された残基を備えた任意のアミノ酸若しくはポリペプチドが付加されたことを特徴とするポリペプチド。

【請求項 1 1】

該遺伝子情報によってコードされていない酵素的もしくは化学的に修飾された残基が、ピログルタミン酸残基、アセチル基、ホルミル基、ビオチン基、Boc 基、若しくは Fmoc 基のいずれかの構造を有することを特徴とする請求項 1 0 記載のポリペプチド。

【請求項 1 2】

配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を持つポリペプチド。

【請求項 1 3】

配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を持つポリペプチド。

【請求項 1 4】

請求項 1 ～ 1 3 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を持つ核酸分子。

【請求項 1 5】

配列番号 4 に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列をもつ核酸分子。

【請求項 16】

配列番号 3 に記載のヌクレオチド配列を持つ核酸分子。

【請求項 17】

配列番号 3 に記載のヌクレオチド配列を持つ核酸分子の相補物とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ ChM1L 活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を持つ核酸分子。

【請求項 18】

配列番号 5 に記載のヌクレオチド配列をもつ核酸分子。

【請求項 19】

配列番号 7 に記載のヌクレオチド配列をもつ核酸分子。

【請求項 20】

請求項 14 から 19 の何れかに記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 21】

核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現を制御する調節性核酸分子と機能的に関連した請求項 14 から 19 の何れかに記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 22】

宿主細胞に、請求項 14 から 19 の何れかに記載の核酸分子を含むように遺伝子を導入した形質転換体。

【請求項 23】

宿主細胞に、核酸によってコードされるポリペプチドの発現を制御する調節性核酸と機能的に関連した請求項 14 から 19 の何れかに記載の核酸分子を発現するように遺伝子を導入した形質転換体。

【請求項 24】

宿主細胞が微生物である、請求項 23 に記載の形質転換体。

【請求項 25】

宿主細胞がエッセリシャ・コリである、請求項 24 に記載の形質転換体。

【請求項 26】

宿主細胞が哺乳類細胞である、請求項 23 に記載の形質転換体。

【請求項 27】

請求項 14 から 19 に記載の核酸分子を含むように遺伝子操作を受けたトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 28】

導入遺伝子が発現される、請求項 27 に記載のトランスジェニック非ヒト動物。

【請求項 29】

配列番号 4 に記載のアミノ酸配列をもつポリペプチドと結合する抗体または抗体断片。

【請求項 30】

請求項 22 から 26 の何れかに記載した形質転換体を培養する工程、生成されたポリペプチドを回収する工程を有するを特徴とする、請求項 1 ～ 13 の何れかに記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 31】

該回収工程に、該形質転換体細胞をタンパク質変性剤存在下で抽出する工程を備えることを特徴とする請求項 30 に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 32】

該抽出工程で得られた抽出物を、請求項 29 に記載の抗体を用いて精製する工程を備えることを特徴とする請求項 31 に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 33】

該形質転換体が、請求項 18 または 19 に記載の核酸分子若しくは請求項 6 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を持つ核酸分子を導入したものであり、該抽出工程で得られた抽出物から金属キレート担体を用いてポリペプチドを精製する工程を含む請求項 31 に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 34】

該形質転換体が、請求項 18 または 19 に記載の核酸分子若しくは請求項 7 に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を持つ核酸分子を導入したものであり、該抽出工程で得られた抽出物から抗FLAGタグ抗体を用いてポリペプチドを精製する工程を含む請求項 31 に記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 35】

該ポリペプチドを該培養工程で得られた培養液から回収することを特徴とする、請求項 30～34 の何れかに記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 36】

該ポリペプチドを含む溶液を、T r i t o n X-114 で処理した後に遠心分離処理を行うことにより発熱物質を除去する工程を含む、請求項 30 から 35 の何れかに記載のペプチドの製造方法。

【請求項 37】

すべての工程を p H8.0 から 8.5 の範囲に調整して行うことを特徴とする、請求項 30 から 36 の何れかに記載のポリペプチドの製造方法。

【請求項 38】

請求項 1 から 13 の何れかに記載のポリペプチドを含む医薬組成物。

【請求項 39】

請求項 1 から 13 の何れかに記載のポリペプチドを含む血管新生抑制剤。

【請求項 40】

請求項 1 から 13 の何れかに記載のポリペプチドを含む破骨細胞形成阻害剤。

【請求項 41】

請求項 1 から 13 の何れかに記載のポリペプチドを含み、ヒトもしくは動物に投与される腱炎、関節リウマチ、変形性関節症、若しくは悪性腫瘍の治療剤。

【請求項 42】

請求項 1 から 13 の何れかに記載のポリペプチドを含み、ヒトもしくは動物に投与される糖尿病性網膜症、緑内障、乾癬、ケロイド、若しくは動脈硬化症の治療剤。

【請求項 43】

請求項 14 から 19 の何れかに記載の核酸分子またはその断片、若しくは請求項 20 または 21 に記載のベクターを含む遺伝子治療用の医薬組成物。

【請求項 44】

請求項 43 記載の医薬組成物からなる、ヒト若しくは動物用の腱炎、関節リウマチ、変形性関節症、または悪性腫瘍の治療剤。

【請求項 45】

請求項 43 記載の医薬組成物からなる、ヒト若しくは動物用の糖尿病性網膜症、緑内障、乾癬、ケロイド、動脈硬化症の治療剤。

【請求項 46】

請求項 29 に記載の抗体または抗体断片を少なくとも 1 種類含む、被験者の体液成分中の分泌型 C h M 1 L を測定するための診断用組成物。

【請求項 47】

請求項 1 から 13 記載のポリペプチドもしくはそれらのペプチドに認識可能な修飾を導入したペプチドを含む、請求項 46 記載の診断用組成物。

【請求項 48】

腱炎、関節リウマチ、変形性関節症、悪性腫瘍のいずれかの病態の診断に用いる請求項 46 または 47 に記載の診断用組成物。

【請求項 49】

糖尿病性網膜症、緑内障、乾癬、ケロイド、動脈硬化症のいずれかの病態の診断に用いられる、請求項 46 または 47 に記載の診断用組成物。

【書類名】明細書

【発明の名称】新規な分泌タンパク質とその製造法及び用途

【技術分野】

【0001】

本発明は、分泌タンパク質の同定法及びその製造法に関する。さらに精製された分泌タンパク質を用いてその活性を評価し、新規な診断、治療薬を開発することに関する。

【背景技術】

【0002】

「血管新生」とは体内で新たに血管が作られることである。血管新生には促進物質と阻害物質があり、そのバランスが血管新生を調節している。血管系は全長10kmにおよび、血管内皮細胞の表面積は7000m²、重量は1kgあると言われており、体内のあらゆる部位に分布する人体最大の臓器と考えられる。胎児期や成長過程において血管新生は盛んに起こっているが、成体の場合は排卵や創傷治癒といった特殊な場合でしか認められない。血管系は生命の維持にとって不可欠であり、上記の血管新生は正常な生体の反応である。

【0003】

一方、上記以外の異常な血管新生は様々な疾患の原因となっている。その代表的な例が癌の血管新生である。癌組織における血管新生は癌の著しい増大、転移能亢進をもたらす。従って、癌細胞に栄養分を供給する血管の新生を阻害すれば、癌は休眠状態 (tumor dormancy) に保たれるはずである。Tumor dormancyを提唱したFolkmanらは癌細胞が産生する血管新生阻害因子を同定し、アンジオスタチン及びエンドスタチンと名づけた (非特許文献1：オライリー (O'Reilly) 等 セル (Cell) (USA) 1994年10月21日発行 79巻

2号 p315~328、非特許文献2：オライリー (O'Reilly) 等 セル (Cell) (USA) 1997年1月24日発行 88巻 2号 p277~285)。これらの血管新生阻害因子がマウスで癌をほぼ完全に退縮させることが明らかになり、その後、血管新生の研究は盛んに進められた。現在、多くの製薬企業が血管新生阻害剤の開発に取り組んでおり、癌を対象に臨床試験が実施されているが (非特許文献3：マター (Matter) 等 ドラッグ・ディスカバリー・トゥデイ (Drug discovery today) (England) 2001年発行 6巻 19号 p1005~1024)、癌を克服するにはいたっておらず、新規な血管新生阻害剤が望まれている。

【0004】

癌以外の疾患、例えば、糖尿病性網膜症、関節リウマチなどでも異常な血管新生が起こっており、その血管新生を阻害することでこれらの疾患を治療できる可能性を示唆するデータが数多く報告されている。従って、血管新生阻害剤は癌のみならずこれらの血管新生を伴う疾患に対する治療薬となると考えられる。

【0005】

血管系は体内のあらゆる組織に分布しているが血管網に乏しい組織も存在する。血管網に乏しい組織としては、軟骨、腱、靱帯、眼球などが挙げられる。間葉系組織では、骨や筋肉は血管が豊富で、骨折や筋肉の損傷が生じてこれを再生する能力を有している。これに対して同じ間葉系組織である軟骨、腱、靱帯は血管網に乏しい組織であり、損傷や断裂が生じると、再生、自然治癒の非常に困難である。一方、これらの無血管組織に血管が侵入すると組織の破壊を引き起こすことから、これらの組織には内因性の血管新生阻害因子が存在し、周囲からの血管侵入を阻害していると考えられている。

【0006】

Chondromodulin-I (ChM-I) は、軟骨に存在する血管新生阻害因子としてウシ胎児軟骨から精製された約25kDaの糖タンパク質であり、軟骨への血管侵入を制御していると考えられている (非特許文献4：開等 ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of biological chemistry) (USA) 1997年12月19日発行 272巻 51号 p32419~32426)。ChM1Lは、ChM-Iと相同性を有するII型の膜貫通タンパク質として発見された (非特許文献5：山名等 バイオケミカル・アンド・バイフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochemical and biophysical research communications) (USA) 2001年2月2日発行 280巻 4号 p1101~1106、特許文献1：W001/23557)

。ChMILは腱、靱帯などの強靱結合組織に特異的に発現する遺伝子であり、これらの組織への血管侵入を制御していると考えられる（特許文献2：W001/53344、非特許文献6：ブランドウ（Brandau）等 デヴェロッパメンタル・ダイナミックスーアン・オフィシャル・パブリケーション・オブ・ザ・アメリカン・アソシエーション・オブ・アナトミスト（Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists） 2001年5月発行 221巻 1号 p72～80、非特許文献7：宿南等 バイオケミカル・アンド・バイフィジックス・リサーチ・コミュニケーションズ（Biochemical and biophysical research communications）（USA） 2001年2月2日発行 280巻 5号 p1323～1327）。

【0007】

上述したように腱、靱帯も軟骨と並んで血管網に乏しい組織である。腱、靱帯は骨や筋肉を繋ぐ重要な組織であり、その損傷や断裂はスポーツ選手のみならず一般の人々にとっても身体運動を制限される深刻な疾患であると考えられる。腱、靱帯組織はこのように重要な組織であるが、軟骨と比較するとこれまで基礎、臨床ともに研究があまり進んでいない。その理由としては、細胞などの材料の確保が難しいこともあるが、腱、靱帯特異的に発現するマーカー分子が存在しなかったことが挙げられる。このような背景から、腱や靱帯における損傷や修復の程度を評価するが可能なマーカー分子の存在が望まれてきた。ChMILは腱や靱帯に特異的に発現することから、これらの組織の損傷や修復を評価するマーカー分子として利用できると考えられる。また、ChMILの活性を制御することにより腱や靱帯の損傷を治療できる可能性がある。

【0008】

骨代謝は、骨芽細胞による骨形成と破骨細胞による骨吸収のバランスにより制御されている。骨代謝の異常により引き起こされる疾患としては、骨粗鬆症、関節リウマチ、骨パジェット病、腎性骨異常栄養症及び骨転移性腫瘍などが知られている。関節リウマチは、血管新生を伴う滑膜細胞の炎症、増殖と共に破骨細胞による骨・軟骨破壊が問題となる疾患であり、骨転移性腫瘍は、腫瘍の増大、転移に血管新生が、骨溶解に破骨細胞が深く関与する疾患である。したがって、これらの疾患において、血管新生と破骨細胞の両方を抑制することができれば、既存の薬剤では達成することができなかった劇的な治療効果が期待できる。このような背景から、血管新生と破骨細胞の両方を抑制する因子の同定が強く望まれている。

【0009】

細胞膜貫通タンパク質は、その細胞外ドメインが切断されて細胞外に分泌されることがある。例えば、Tumor necrosis factor- α （TNF- α ）はII型の膜貫通タンパク質として合成され、膜貫通タンパク質としても機能するが、TNF- α converting enzymeなどのプロテアーゼによって切断され、分泌性のタンパク質としても機能することが知られている。ChM-Iは、II型の膜タンパク構造を有するが、furinなどのプロテアーゼが認識するサイト（RRER）でプロセッシングを受けてC末側の120アミノ酸が細胞外に分泌されることが知られている（非特許文献4 および、非特許文献8：アジザン（Azizan）等 ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー（The Journal of biological chemistry）（USA）

2001年6月29日発行 276巻 26号 p23632～23638）。ChMILは、ChM-Iと相同性を有するが、ChM-Iのような典型的なプロテアーゼ認識サイトはなく、膜貫通タンパク質として機能すると推定されており、分泌型タンパク質の報告はない（特許文献3：W000/12708、特許文献4：W000/29579、特許文献5：W001/23557、特許文献6：W001/48203、特許文献7：W001/53344、非特許文献5 1101-6.、非特許文献6、非特許文献7）。ChMILの血管新生阻害作用は既に報告されているが、その活性ドメインはChM-Iと相同な領域を人工的に作製したものであり、分泌型ChMILが存在するのどうかは不明である。また、その活性評価法はアデノウイルスによる遺伝子導入あるいは少量の組換えタンパク質を用いた検討であり、定量的かつ詳細な活性評価の報告はなく、その作用メカニズムも不明である。

【0010】

組換えタンパク質を医薬品として開発する際には、活性タンパク質を大量に調製する必

要がある。一般的には、バクテリア系、特に大腸菌を用いた発現系は工業スケールでのタンパク質生産に幅広く利用されている。大腸菌での発現は、高レベルの発現を可能にするベクターの使用と高密度での培養により非常に高レベルの組換えタンパク質を得ることが可能である。しかしながら、重要な問題として大腸菌が組換えタンパク質を含む封入体を形成しやすいことがある。実際、血管新生阻害剤として臨床試験が実施されているエンドスタチンも大腸菌で発現させると封入体を形成し、その再生が困難であるため（非特許文献2）、現在でも改良法が検討されている（特許文献8：特表2002-504494）。

【0011】

ChM-Iは、その血管新生阻害活性を利用して抗癌剤として開発することも検討されたが、Chinese hamster ovary (CHO) 細胞で発現させた場合、多量体を形成するため再生過程が必要であり、大量のタンパク質を得ることが困難であった（非特許文献8）。また、ChM-Iを大腸菌で発現させ、大量のタンパク質を得ることが試みられているが、封入体を形成し、その再生がうまくいかないと報告されている（非特許文献9：山川等 日本分子生物学会第25回年会・講演要旨集 2001年11月発行2P-0206）。ChM1LはCOS7細胞の培養液中にタンパク質を発現させ、培養液中から活性タンパク質を得ることが可能であるが、その発現量は低く、ChM-Iと同様に多量体を形成しており、大量のタンパク質を得ることはできない（特許文献9：W001/23557）。ChM-Iと同様にChM1Lを大腸菌で発現させると封入体を形成し、再生がうまくいかないと報告されている（非特許文献10：長谷川等 日本分子生物学会第25回年会・講演要旨集 2001年11月発行2P-0770）。このような背景から、ChM1Lを大腸菌で大量に発現、精製することは非常に困難であると予測されるが、ChM1Lを医薬品として開発するためには、大量の精製タンパク質を得ることは必須である。また、ChM1Lの生理機能の解明、抗体作製及び活性評価には組換えタンパク質が必要である。このような背景からChM1Lを大腸菌で発現させ組換えタンパク質を大量に調製する方法の確立が望まれている。また、ChM1Lの大腸菌での組換えタンパク質の大量調製法が確立できれば、相同分子であるChM-Iの大量調製も可能になることが期待される。

【0012】

【特許文献1】W001/23557号パンフレット

【特許文献2】W001/53344号パンフレット

【特許文献3】W000/12708号パンフレット

【特許文献4】W000/29579号パンフレット

【特許文献5】W001/23557号パンフレット

【特許文献6】W001/48203号パンフレット

【特許文献7】W001/53344号パンフレット

【特許文献8】特表2002-504494号公報

【特許文献9】W001/23557号パンフレット

【非特許文献1】オライリー (O'Reilly) 等 セル (Cell) (USA) 1994年10月21日発行 79巻 2号 p 315~328

【非特許文献2】オライリー (O'Reilly) 等 セル (Cell) (USA) 1997年1月24日発行 88巻 2号 p 277~285)

【非特許文献3】マター (Matter) 等 ドラッグ・ディスカバリー・トゥデイ (Drug discovery today) (England) 2001年発行 6巻 19号 p 1005~1024

【非特許文献4】開等 ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of biological chemistry) (USA) 1997年12月19日発行 272巻 51号 p 32419~32426

【非特許文献5】山名等 バイオケミカル・アンド・バイフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochemical and biophysical research communications) (USA) 2001年2月2日発行 280巻 4号 p 1101~1106

【非特許文献6】ブランドウ (Brandau) 等 デヴェロップメンタル・ダイナミック・スーアン・オフィシャル・パブリケーション・オブ・ザ・アメリカン・アソシエーション・オブ・アナトミスト (Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists)

f the American Association of Anatomists) (USA) 2001年5月発行 221巻 1号 p 72~80

【非特許文献 7】宿南等 バイオケミカル・アンド・バイフィジックス・リサーチ・コミュニケーションズ (Biochemical and biophysical research communications) (USA) 2001年2月2日発行 280巻 5号 p 1323~1327

【非特許文献 8】アジザン (Azizan) 等 ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of biological chemistry) (USA) 2001年6月29日発行 276巻 26号 p 32419~32426

【非特許文献 9】山川等 日本分子生物学会第25回年会・講演要旨集 2001年11月発行 2P-0206

【非特許文献 10】長谷川等 日本分子生物学会第25回年会・講演要旨集 2001年11月発行 2P-0770

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明が解決しようとする課題は、分泌型ChM1Lタンパク質を同定し、そのN末端アミノ酸配列を明らかにすることである。さらに、組換えChM1Lのタンパク質の大量調製法を確立し、その活性の評価法を提供することである。さらに、組換えChM1Lタンパク質を血管新生を伴う疾患、例えば癌、関節リウマチ及び糖尿病性網膜症などの疾患に対する治療薬として提供することである。さらに、破骨細胞の関与する疾患、例えば、骨粗鬆症、関節リウマチ、骨パジェット病、高カルシウム血症、歯周骨喪失及び骨溶解性腫瘍などの疾患に対する治療薬を提供することである。さらに、組換えChM1Lタンパク質及びこれを抗原として作製した抗体を用いてChM1Lの関与する疾患、例えば髄炎の診断及び治療法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明は、以下の発明を提供する。

- 1) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を持つポリペプチド。
- 2) ChM1L 活性を有し、かつ、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列の 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換、若しくは付加されたアミノ酸配列を有することを特徴とするポリペプチド。
- 3) ChM1L 活性を有し、かつ、配列番号 4 に記載のアミノ酸配列と少なくとも 70 %以上の相同性を持つアミノ酸配列を有することを特徴とするポリペプチド。
- 4) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列を持つポリペプチドのN末端及び／又はC末端に任意のアミノ酸若しくはポリペプチドが付加したポリペプチド。
- 5) 該N末端に付加したアミノ酸若しくはポリペプチドが、メチオニンもしくはそのN末端にメチオニン残基を持つポリペプチドであることを特徴とする上記4)記載のポリペプチド。
- 6) 該N末端及び／又はC末端に付加した任意のアミノ酸若しくはポリペプチドが、連続した 6 から 8 個のヒスチジン残基を含む形のアミノ酸配列を持つポリペプチドであることを特徴とする、上記4)に記載のポリペプチド。
- 7) 該N末端及び／又はC末端に付加した任意のアミノ酸若しくはポリペプチドが、FL AGタグ配列を含む形のアミノ酸配列を持つポリペプチドであることを特徴とする、上記4)に記載のポリペプチド。
- 8) 該N末端及び／又はC末端に付加した任意のアミノ酸若しくはポリペプチドが、オワンクラゲ由来蛍光タンパク質およびその類縁体のアミノ酸配列を持つポリペプチドであることを特徴とする、上記4)に記載のポリペプチド。
- 9) 該N末端及び／又はC末端に付加した任意のアミノ酸若しくはポリペプチドが、分泌型アルカリフォスファターゼおよびその類縁体のアミノ酸配列を持つポリペプチドであることを特徴とする、上記4)に記載のポリペプチド。

10) 配列番号 9 に記載のアミノ酸配列を持つポリペプチドの N 末端に、遺伝子情報によってコードされていない酵素的もしくは化学的に修飾された残基、または、その N 末端に遺伝子情報によってコードされていない酵素的もしくは化学的に修飾された残基を備えた任意のアミノ酸若しくはポリペプチドが付加されたことを特徴とするポリペプチド。

11) 該遺伝子情報によってコードされていない酵素的もしくは化学的に修飾された残基が、ピログルタミン酸残基、アセチル基、ホルミル基、ビオチン基、Boc 基、若しくは Fmoc 基のいずれかの構造を有することを特徴とする上記 10) に記載のポリペプチド。

12) 配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を持つポリペプチド。

13) 配列番号 8 に記載のアミノ酸配列を持つポリペプチド。

14) 上記 1) から 13) に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を持つ核酸分子。

15) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列をもつ核酸分子。

16) 配列番号 3 に記載のヌクレオチド配列を持つ核酸分子。

17) 配列番号 3 に記載のヌクレオチド配列を持つ核酸分子の相補物とストリジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ ChMIL 活性を有するポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を持つ核酸分子。

18) 配列番号 5 に記載のヌクレオチド配列をもつ核酸分子。

19) 配列番号 7 に記載のヌクレオチド配列をもつ核酸分子。

20) 上記 14) から 19) の何れかに記載の核酸分子を含むベクター。

21) 核酸分子によってコードされるポリペプチドの発現を制御する調節性核酸分子と機能的に関連した上記 14) から 19) の何れかに記載の核酸分子を含む発現ベクター。

22) 宿主細胞に、上記 14) から 19) の何れかに記載の核酸分子を含むように遺伝子を導入した形質転換体。

23) 宿主細胞に、核酸によってコードされるポリペプチドの発現を制御する調節性核酸と機能的に関連した上記 14) から 19) の何れかに記載の核酸分子を発現するように遺伝子を導入した形質転換体。

24) 宿主細胞が微生物である、上記 23) に記載の形質転換体。

25) 宿主細胞がエッセリシャ・コリである、上記 24) に記載の形質転換体。

26) 宿主細胞が哺乳類細胞である、上記 23) に記載の形質転換体。

27) 上記 14) から 19) に記載の核酸分子を含むように遺伝子操作を受けたトランスジェニック非ヒト動物。

28) 導入遺伝子が発現される、上記 27) に記載のトランスジェニック非ヒト動物。

29) 配列番号 4 に記載のアミノ酸配列をもつポリペプチドと結合する抗体または抗体断片。

30) 上記 22) から 26) の何れかに記載した形質転換体を培養する工程、生成されたポリペプチドを回収する工程を有するを特徴とする、上記 1) ～ 13) の何れかに記載のポリペプチドの製造方法。

31) 該回収工程に、該形質転換体細胞をタンパク質変性剤存在下で抽出する工程を備えることを特徴とする上記 30) に記載のポリペプチドの製造方法。

32) 該抽出工程で得られた抽出物を、上記 29) に記載の抗体を用いて精製する工程を備えることを特徴とする上記 31) に記載のポリペプチドの製造方法。

33) 該形質転換体が、上記 18) または 19) に記載の核酸分子若しくは上記 6) に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を持つ核酸分子を導入したものであり、該抽出工程で得られた抽出物から金属キレート担体を用いてポリペプチドを精製する工程を含む、上記 31) に記載のポリペプチドの製造方法。

34) 該形質転換体が、上記 18) または 19) に記載の核酸分子、若しくは上記 7) に記載のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を持つ核酸分子を導入したものであり、該抽出工程で得られた抽出物から抗 FLAG タグ抗体を用いてポリペプチドを精製する工程を含む上記 31) に記載のポリペプチドの製造方法。

35) 該ポリペプチドを該培養工程で得られた培養液から回収することを特徴とする、上記30)～34)の何れかに記載のポリペプチドの製造方法。

36) 該ポリペプチドを含む溶液を、T r i t o n X-1 1 4 で処理した後に遠心分離処理を行うことにより発熱物質を除去する工程を含む、上記30)から35)の何れかに記載のペプチドの製造方法。

37) すべての工程をp H8.0から8.5の範囲に調整して行うことを特徴とする、上記30)から36)の何れかに記載のポリペプチドの製造方法。

38) 上記1)から13)の何れかに記載のポリペプチドを含む医薬組成物。

39) 上記1)から13)の何れかに記載のポリペプチドを含む血管新生抑制剤。

40) 上記1)から13)の何れかに記載のポリペプチドを含む破骨細胞形成阻害剤。

41) 上記1)から13)の何れかに記載のポリペプチドを含み、ヒトもしくは動物に投与される腱炎、関節リウマチ、変形性関節症、若しくは悪性腫瘍の治療剤。

42) 上記1)から13)の何れかに記載のポリペプチドを含み、ヒトもしくは動物に投与される糖尿病性網膜症、緑内障、乾癬、ケロイド、若しくは動脈硬化症の治療剤。

43) 上記14)から19)の何れかに記載の核酸分またはその断片、若しくは上記20)または21)に記載のベクターを含む遺伝子治療用の医薬組成物。

44) 上記43)記載の医薬組成物からなる、ヒト若しくは動物用の腱炎、関節リウマチ、変形性関節症、または悪性腫瘍の治療剤。

45) 上記43)記載の医薬組成物からなる、ヒト若しくは動物用の糖尿病性網膜症、緑内障、乾癬、ケロイド、動脈硬化症の治療剤。

46) 上記29)に記載の抗体または抗体断片を少なくとも1種類含む、被験者の体液成分中の分泌型C h M 1 Lを測定するための診断用組成物。

47) 上記1)から13)記載のポリペプチドもしくはそれらのペプチドに認識可能な修飾を導入したペプチドを含む、上記46)記載の診断用組成物。

48) 腱炎、関節リウマチ、変形性関節症、悪性腫瘍のいずれかの病態の診断に用いる上記46)または47)に記載の診断用組成物。

49) 糖尿病性網膜症、緑内障、乾癬、ケロイド、動脈硬化症のいずれかの病態の診断に用いられる、上記46)または47)に記載の診断用組成物。

【発明の効果】

【0 0 1 5】

ChM1Lは膜結合型のタンパク質として報告されてきたが、本発明により、分泌型ChM1Lが存在することが判明した。本発明では、その切断点を決定することに成功し、組換えタンパク質の大量調製法を確立した。これまでに報告のあるChM1Lの活性評価はChM-Iと相同な細胞外領域（人工的に作製した領域）を用いて実施されており（W0 01/23557、Oshima等 インベスティゲーション・オブタルモロジー・アンド・ヴィジュアル・サイエンス（Investigative ophthalmology & visual science）（USA） 2003年5月発行 4巻5号 p1814～1823）、生理的に存在する分泌型ChM1Lの活性評価は本発明によりはじめて可能になった。膜結合型のタンパク質は通常疎水性のアミノ酸を多く含む部分を含有し、そのために体液組成などにおいて低い溶解度を示す場合が多く、そのままの構造では医薬品として不適であることが多い。また、その様な疎水性アミノ酸の多い部分を欠損させた人工的なポリペプチドをコードする遺伝子を用いて発現させた組換えタンパク質は、立体構造などが異常となり本来の活性を示さない場合も多々見られる。本発明においては分泌型のChM1Lの構造を解明し、生理的に活性を持ち体液に可溶性分子の取得を可能にしたことから、ChM1Lの活性を医薬品として応用することを可能にした。

【0 0 1 6】

また、組換えタンパク質を医薬品として応用するためには、できるだけ抗原性の低いタンパク質を、エンドトキシンを除去して大量に精製する必要がある。本発明では、生理的に存在し、抗原性が低いと考えられる分泌型ChM1Lタンパク質の大腸菌による大量発現、精製法を確立し、細胞や生体に投与可能なレベルまでエンドトキシンを除去することを可能にし、組換えChM1Lタンパク質を医薬品として開発することを可能にした。

【0017】

毛細血管が新たにできる「血管新生 (angiogenesis)」という現象が、癌の増大・転移や、関節リウマチの病態形成等に関わっていることは広く知られている。一般的に血管新生は、(1) 血管基底膜とその周囲の細胞外マトリックスのMMPなどによる消化、(2) 血管内皮細胞の遊走、(3) 血管内皮細胞の増殖、(4) 管腔の形成 (capillary tube formation) というステップをとることが知られている。実施例で示したようにChM1Lは、上記の(1)～(4)のすべてのステップを阻害することが明らかになった。従って、ChM1Lは癌、関節リウマチ、乾癬、糖尿病性網膜症などの血管新生を伴う疾患の治療薬として使用できると考えられる。

【0018】

破骨細胞による骨吸収が関与する疾患としては、骨粗鬆症、関節リウマチ、骨パジェット病、高カルシウム血症、歯周骨喪失及び骨溶解性腫瘍などが知られている。本発明により、ChM1Lは破骨細胞形成を抑制することが明らかになったことから、ChM1Lはこれらの疾患の治療薬として使用可能であると考えられる。

【0019】

本発明により、ChM1L及びChM-Iは血管新生阻害作用と破骨細胞形成抑制作用を併せ持つ分子であることがはじめて明らかになり、上記の様々な疾患に対する治療薬となりうることが明らかとなった。特に、関節リウマチや骨転移性の腫瘍においては、その病態の進行に血管新生と破骨細胞が深く関与していることから、血管新生と破骨細胞を抑制することで劇的な治療効果が得られると期待される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

<ChM1L活性を有する分泌型ポリペプチドもしくはそれをコードする核酸分子>

分泌型ChM1Lの構造解析を行うことで、より低分子でChM1L活性を示すポリペプチドを提供する。ここでChM1L活性とは血管新生抑制活性 (W001/023557) もしくは新たに発見した破骨細胞の形成あるいは活性化を抑制する活性を含む生理的・薬理学的活性をいう。分泌型ChM1Lの構造は配列番号4に示したアミノ酸配列を持つが、さらにその配列よりChM1L活性を示すのに最適な形を抽出してより低分子のChM1L活性を得ることも可能である。

【0021】

分泌型ChM1Lを遺伝子工学的に取得する方法としては、分泌型ChM1L配列若しくはその部分配列を含むポリペプチドをコードする遺伝子の5'末端に開始コドンでありメチオニン残基に相当するコドンである塩基配列ATGを付加した形を用いることができる。実施例3においては配列番号4に示した分泌型ChM1Lをコードする遺伝子配列の5'末端にメチオニンとHisタグおよびFLAGタグを付加して発現させる形の遺伝子それによって産生されたポリペプチドを用いているが、この構造に限定されるものではない。

【0022】

配列番号4と異なる形でChM1L活性を有するポリペプチドおよびそれをコードする核酸分子を取得することも可能である。例えば、分泌型ChM1L配列中の一つ以上のアミノ酸残基を、そのアミノ酸と化学的性状もしくは構造的に類似のアミノ酸残基と置き換えた形で分泌型ChM1Lを取得することができる。この方法については一般的な遺伝子組換え技術を用いて改変遺伝子を作成して発現させることによって容易に実施できる。また全長ChM1L (W001/023557) 以外のポリペプチドおよび核酸分子は、ChM1Lのアミノ酸配列もしくは核酸塩基配列と相溶性の高い分子を取得することによっても可能である。そのための方法としてはすでに配列が公知であるタンパク質もしくは遺伝子塩基配列のデータベースの中から分泌型ChM1Lのアミノ酸配列と相溶性の高いポリペプチド配列もしくは核酸塩基配列を探ることができる。具体的には分泌型ChM1Lのアミノ酸配列もしくは核酸塩基配列を用いてEMBL・DDBJなどのデータベースに対してBLASTサーチ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> および アルチュール (Altschul) 等 メソッズ・イン・エンザイムオロジー (Methods in Enzymology) (USA) 1996年発行 266巻 p460~480.) を行い、相溶性の高い配列を探すことである。たとえば配列番号4および配列番号3に示したヒト分泌型ChM1Lア

ミノ酸配列およびDNA塩基配列を用いてNCBIホームページで利用可能なBLASTサーチにおいてNRデータベースでBLASTnもしくはBLASTpプログラムでサーチを行うと高い相同性を示す分子としてヒト以外のChM1L配列が得られるが、用いるデータベースやアルゴリズムを換えることによって種々の分泌型ChM1Lと相同性を持つ分子を探すことが可能である。また、ChM1LとChM1L活性の一部において同質と報告されているChM-I分子とのアミノ酸の相同性をNCBIホームページ上のBLASTpプログラムでフィルターなしの条件で比較して見たところ、全長のヒトChM1Lと全長のヒトChM-Iとはアミノ酸配列の約37%が完全に一致 (Identities) して性状の似たアミノ酸同士の置換を含む (Positives) と約55%の相同性を示したのに対して、配列番号 4 に記載の分泌型ヒトChM1Lのアミノ酸配列に対してのヒトChM-Iの対応する配列は約60%のIdentitiesおよび約69%のPositivesという高い相同性を示したことから、本発明で開示した分泌型ChM1Lの構造を用いることによってより効率的にChM1L活性を有する分子を探すことが可能である。そのような形で得られたChM1Lと相同性を示す分子の遺伝子はcDNAライブラリーなどからPCR法やその他の方法を用いてタンパク質をコードする領域の遺伝子を取得することが可能である。また、配列の解明されていない核酸分子からChM1L活性を持つ分子を探すには、分泌型ChM1Lの核酸塩基配列もしくはその部分配列を用いてのハイブリダイゼーション法を用いることができる。具体的には任意の生物種に由来するcDNA・ゲノムDNA断片等の挿入されたプラスミドベクターもしくはファージベクターを大腸菌等の宿主に導入したライブラリーを作成し、それを適当な選択薬剤を含む寒天培地プレート上で培養した後、生じた組換え大腸菌クローンもしくはファージクローンをニトロセルロース膜等に写し取ってアルカリや界面活性剤を含む状態で菌体もしくはファージを溶かしてそこに含まれるDNAを膜に固定化し、その膜に対して分泌型ChM1LをコードするDNAもしくはその断片を32Pなどで標識して一本鎖にしたプローブを溶解した適当なハイブリダイゼーション溶液と適切な温度下で反応させる。反応後、その膜をx2 SSCなどで洗浄して余分なプローブを除去した後、高ストリジェントな条件、たとえばx 0.1 SSCで65℃、もしくは中程度にストリジェントな条件、たとえばx 0.5 SSCで65℃の条件で洗浄し、その膜を暗黒下でX線フィルムと接触させて感光させる。数時間から数日の間低温フリーザー等の中で感光させたX線フィルムを現像して感光したスポットを検出し、その膜に転写を行ったもののプレートの対応する位置にある大腸菌もしくはファージクローンを採取して培養した後、ベクター中に挿入されている遺伝子の配列解析を行うことで分泌型ChM1L遺伝子と相同性の高い遺伝子を取得できる。また、その遺伝子配列を用いてさらにcDNA若しくはゲノムライブラリーでのハイブリダイゼーションによるクローンの取得やプライマーエクステンション法などで周辺配列を同定することでタンパク質をコードしている遺伝子構造を解明してChM1Lと相同性のある分子の核酸分子を取得できる。

【0023】

以上のような方法で取得したChM1Lのアミノ酸置換改変体や、ChM1Lと相同性を持つ分子は、後述する組換えタンパク質の取得法と同様な方法で作成し、実施例 5 から 13 に記載の方法でChM1L活性を試験することで、ChM1L活性を同定することが可能である。

【0024】

また、安定性・可溶性・精製の効率化・発現効率の向上・製造分子の検出などを目的として、分泌型ChM1Lのアミノ酸配列を含む形で他の公知もしくは新規のアミノ酸配列と融合した形でのポリペプチドを作成することが可能である。またその方法としては遺伝子組換えにより発現させる方法や、酵素的もしくは科学的にポリペプチドを会合させる方法 (ハーマンソン (Hermanson) 等 バイオコンジュゲート・テクニクス (Bioconjugate techniques) (USA) 1996年発行 Academic Press) など公知の方法で実施することが可能である。その例としては、分泌型ChM1Lの配列に6個以上の連続したヒスチジン残基を付加するもしくはFLAGタグといわれる配列を含む形でポリペプチドを作成ことによって、金属キレート担体もしくは抗体を用いて精製を容易に行うことができる。また別の例としては、分泌型ChM1Lを含むポリペプチドとオワンクラゲ由来蛍光タンパク質もしくは分泌型アルカリフォスファターゼと融合した形で発現させることによってChM1L分子を容易に検出できる形で取得することも可能である。オワンクラゲ由来蛍光タンパク質との融合タンパ

ク質においては蛍光強度を測定することによって、また分泌型アルカリフォスファターゼとの融合タンパク質においては該酵素とその基質を反応させることによって生じる発色・発光もしくは蛍光の強度を測定することによってそれらの融合タンパク質の存在を検出できる。この場合、これらの融合タンパク質は分泌型ChM1Lを含むポリペプチドをコードする遺伝子配列の5'もしくは3'配列に、オワンクラゲ由来蛍光タンパク質もしくは分泌型アルカリフォスファターゼをコードする遺伝子配列をそれぞれのタンパク質のアミノ酸配列が翻訳される形で結合させ発現ベクターに組み込み、適当な宿主で発現させることによって取得することが可能である。

【0025】

以上述べてきたChM1Lとそれ以外のアミノ酸配列を融合させた形で発現させたタンパク質は分泌型ChM1Lを含むアミノ酸配列とそれに付加した配列が結合したままの状態、もしくはその付加したアミノ酸配列を除去した形で得ることができる。付加したアミノ酸配列を除去する方法の一例としては、分泌型ChM1Lを含む配列とそれに付加する配列の間にリジン残基が挿入されるように遺伝子構築を行い、発現させて得たタンパク質をエンドペプチターゼLys-C (EC 3.4.21.50) で処理することによってそのリジン残基C末端部分で切断して精製することによって、分泌型ChM1L配列を含む部分のポリペプチドを回収することが可能である。

【0026】

また、他の分泌型ChM1Lの形態としては、生体組織由来もしくは遺伝子組換え法によって生産された分泌型ChM1Lを取得した後に、その構造を修飾することが可能である。実施例2に示したように哺乳類細胞で全長型ChM1L遺伝子を導入して発現させ、その培地中より取得した分泌型ChM1LはそのN末端のグルタミン残基がピログルタミン酸に転換されていた。生体内のタンパク質やペプチドホルモン等においては、そのN末端がピログルタミン酸に転換された形やアセチル基もしくはホルミル基等で修飾されている形をとることがあり、そのことによってタンパク質やペプチドホルモンの安定性の向上や活性の変化を起こすことが知られている。このことから必要に応じて分泌型ChM1L分子のN末端を翻訳後に修飾した形態の分子を用いることも可能である。そのような分子を得る方法の一例としては、分泌型ChM1L分子を含む配列のN末端をグルタミン残基となるように発現させ、得られたポリペプチドを5~10%酢酸溶液等酸性条件で処理することによって、N末端がピログルタミンに転換された分子を得ることができる (パーク (Park) 等 プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) (USA) 1991年3月発行 p 22046~2050)。また別の例としては、N末端に α アミノ基を持つ任意のアミノ酸残基となるように発現させた分泌型ChM1L配列を含むポリペプチドを、Sulfo-NHS-Acetateや無水酢酸で処理することによってN末端がアセチル化されたペプチドを得る方法は広く知られている。その他、取得した分泌型ChM1L配列を含むポリペプチドを蛍光物質などの化合物で処理して修飾することも可能である。(ハーマンソン (Hermanson) 等 バイオコンジュゲート・テクニクス (Bioconjugate techniques) (USA) Academic Press 1996年発行)

【0027】

<組換えタンパク質>

ChM1Lタンパク質の発現及び精製は ChM1L遺伝子が宿主細胞中で発現できる組換え体DNAを作製し、これを宿主細胞に導入して形質転換し、形質転換体を培養することにより行われる。

【0028】

ここで宿主細胞としては、真核性宿主細胞及び原核性宿主細胞のいずれを用いることもできる。

真核性宿主細胞には、脊椎動物、酵母及び昆虫細胞等が含まれる。脊椎動物細胞としては、例えばCHO細胞、293T細胞及びCOS7細胞等が挙げられる。

【0029】

脊椎動物の発現ベクターとしては、通常発現しようとする遺伝子上流に位置するプロモーター、ポリアデニル化部位及び転写終了配列等を保有するものを使用できる。該発現ベクターとしては例えば、SV40の初期プロモーターを保有するpSV2dhfr (Mol. Cell. Bio. 1., 854, 1981)、pcDNA3.1(+) (Invitrogen社) 及びpCAGGS (Gene, 108, 193-200, 1991) 等を例示できる。

【0030】

真核細胞中で目的タンパク質を発現させる手段は、それ自体当該分野では多くの系が周知である。

例えば酵母中で発現させる系としては特開昭57-159489号公報に記載された「酵母中でタンパク質の発現」が挙げられ、昆虫細胞中で発現させる系としては特開昭60-37988号公報に記載された「組換えバキュロウイルス発現ベクターの製法」が挙げられ、哺乳類動物細胞中で発現させる系としては特開平2-171198号公報に記載された「真核性発現の改良」が挙げられるが、もちろんこれら以外にも多数存在する。

【0031】

ChM1L遺伝子は、例えば、大腸菌、枯草菌およびストレプトマイセス等の原核性宿主細胞内でも発現し得る。例えば、上記宿主としての大腸菌はEcherichia coli K12株等がよく用いられ、ベクターとしてはpBR322及びその改良ベクターがよく用いられるが、これらに限定されず公知の各種菌株及びベクターも利用できる。プロモーターとしては、例えば、大腸菌ラクトース (lac)、大腸菌trp等のプロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。また、上記のプロモーターは、いずれも既に特性化されており、当業者が熟知しているものであって、合成的にあるいは、既知のプラスミドから組み立てることができるものである。

【0032】

本発明の例示DNA配列、プラスミドおよびウイルスには多くの修飾や変更が可能である。例えば、遺伝暗号の同義性により、タンパク質の暗号領域全体を通して、ヌクレオチドの置換を行うことができる。そのような配列は、ChM1L遺伝子の塩基配列又はそれがコードするタンパク質のアミノ酸配列から推定することができ、下記の従来からの合成法により組み立てることができる。そのような合成法は、実質上、イタクラの方法 (Itakura et al, Science 198, 1059, 1977) ならびにクレアの方法 (Crea et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 5765, 1978) に従って行うことができる。従って、本発明は特に例示した塩基配列、プラスミドおよびウイルスに限定されるものではない。

【0033】

かくして得られる所望のChM1L遺伝子の宿主細胞への導入方法及びこれによる形質転換方法としては、一般的な各種方法を採用できる。また、得られる形質転換体は常法に従い培養でき、ChM1Lタンパク質が生産される。培養に用いられる培地としては、採用した宿主細胞に応じて慣用される各種のものを適宜選択でき、その培養も宿主細胞の成育に適した条件下で実施できる。

【0034】

上記により、形質転換体の細胞内、細胞外あるいは細胞膜上に該タンパク質が生産される。ChM1Lタンパク質は、所望によりその物理学的性質、化学的性質等を利用した各種の分離操作[日本生化学会編 「生化学データブックII」 第1版第1刷、株式会社東京化学同人 1980年6月23日発行 p 1175~1259; Arakawa等 バイオケミストリー (Biochemistry) (USA) 1986年12月16日発行25巻25号 p 8274~8277 (1986); ラングレイ (Langley) 等 ヨーロピアン・ジャーナル・オブ・バイオケミストリー (European Journal of Biochemistry) (Germany) 1987年3月2日発行 163巻2号 p 313~321等参照]により分離、精製できる。該方法としては、具体的には例えば通常の再構成処理、タンパク質沈殿剤による処理 (塩析法)、遠心分離、浸透圧ショック法、超音波破碎、限外ろ過、ゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等の各種液体クロマトグラフィー、透析法、これらの組合わせ等を例示できる。また、該タンパク質にアフィニティータグを融合した

タンパク質を発現させれば、このタグを利用してアフィニティー精製を実施することが可能である。ここで述べるアフィニティータグとは例えば、ポリヒスチジンタグ (Hisタグ、シスク (Sisk) 等 ジャーナル・オブ・ヴァイロロジー (Journal of Virology) (USA) 1994年2月発行 68巻2号 p 766~775) 及びFLAGタグ (ホップ (Hopp) 等 バイオテクノロジー (Biotechnology) 1988年発行 6巻 p 1204~1210) が挙げられる。これらのアフィニティータグを融合したChM1Lタンパク質の発現及び検出は、実施例1で述べるように実施することが可能であり、これらのタグを用いてChM1Lタンパク質を精製することも実施例3で述べるように実施し得る。本発明のChM1Lタンパク質の製造方法は、より具体的には実施例3で詳細に述べる。

【0035】

<合成ペプチド>

分泌型ChM1Lタンパク質を取得する方法としては化学合成的に該ポリペプチドを合成することができる。

この場合、固相合成法や液相合成法など一般的に用いられるペプチド合成法を利用することができる。ペプチド合成に於ける縮合法やアミノ酸残基の保護、および合成後の保護基の脱離については公知の方法を利用できる (泉谷等 ペプチド合成の基礎と実験 丸善株式会社 1975年発行、矢島等 日本生化学会編 生化学実験講座1 タンパク質の化学 I V 東京化学同人株式会社 1977年発行)。また、分泌型ChM1Lタンパク質のペプチド配列全体を一度に合成することも可能であるが、該タンパク質の部分的なペプチドを其々合成してその部分ペプチドを縮合する方法も用いることができる (日本生化学会編 生化学実験講座 タンパク質IV 合成および発現 東京化学同人株式会社 1991年発行)。ペプチド合成において用いられるアミノ酸の α アミンは通常tBoc基やFmoc基で保護されているが、最終的に得られるペプチドについてこれらの保護基をつけたままもしくは脱保護した形とすることが可能である。また必要に応じて、そのペプチドの脱保護されたアミノ末端を酵素的若しくは化学的にピログルタミン酸やアセチル基もしくはホルミル基などで修飾された形とすることも可能である (ハーマンソン (Hermanson) 等 バイオコンジュゲート・テクニクス (Bioconjugate techniques) (USA) Academic Press 1996年発行)。具体的な例としては分泌型ChM1Lの配列を含むペプチドをN末端にグルタミンを持つ形で合成し、該ペプチドを5から10%酢酸溶液等の希酸による処理で環化させることでピログルタミン酸に変化させることができる (パーク (Park) 等 プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・オブ・ザ・ユナイテッド・ステイツ・オブ・アメリカ (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America) (USA) 1991年3月発行 p 22046~2050)。

【0036】

<抗体>

分泌型ChM1Lタンパク質に対する抗体は、骨・関節疾患の診断・治療に用いることができる。例えば、診断においては、抗体を利用したウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、ELISA法などを利用することができる。また治療においては、ChM1Lタンパク質の活性を制御する抗体により行うことができる。

【0037】

上記で用いる抗体は、当業者に周知の技法を用いて得ることができる。本発明に用いる抗体は、ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体 (ミルスタイン (Milstein) 等 ネイチャー (Nature) (England) 1983年10月6日発行 305巻5934号 p 537~540) であることができる。例えば、ChM1Lに対するポリクローナル抗体は、抗原を感作した哺乳動物の血清等から回収することができる。ChM1Lに対するモノクローナル抗体は、抗原を感作した哺乳動物から免疫細胞を取り出して骨髓腫細胞などと細胞融合させることにより得られたハイブリドーマをクローニングして、その培養物から回収することができる。

【0038】

ChM1Lタンパク質の検出には、これらの抗体を適宜標識してやればよい。また、この抗

体を標識せずに、該抗体に特異的に結合する物質、例えば、プロテインAやプロテインGを標識して間接的に検出することもできる。具体的な検出方法としては、例えばELISA法を挙げることができる。

【0039】

抗原に用いる蛋白質もしくはその部分ペプチドは、例えばChM1L遺伝子もしくはその一部を発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を作成し、該形質転換体を培養して組換えタンパク質を発現させ、発現させた組換えタンパク質を培養体または培養上清から精製することにより得ることができる。あるいは、該遺伝子によってコードされるアミノ酸配列、あるいは全長cDNAによってコードされるアミノ酸配列の部分アミノ酸配列からなるオリゴペプチドを化学的に合成し、免疫原として用いることもできる。免疫する動物としては、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ、ハムスターなどが用いられる。

【0040】

<診断方法>

本発明の診断方法については、通常、被験者から採取された生体試料を試料とする。生体試料としては、血液試料が望ましい。血液試料とは、全血、あるいは全血から得られた血漿や血清を用いることができる。また本発明における生体試料としては、血液のほか、関節液、バイオプシーにより採取された関節軟骨片、滑膜組織、腱組織、靱帯組織、筋組織、涙液なども用いることができる。これらの生体試料の採取方法は公知である。

【0041】

上記の生体試料からライセートを調製すれば、ChM1Lタンパク質の免疫学的な測定のための試料とすることができる。生体試料のライセートの抽出には、市販のキットを利用すると便利である。またChM1Lタンパク質が血中や関節液に分泌されていれば、被験者の血液や血清などの体液試料に含まれるの量を測定することが可能である。上記試料は、必要に応じて緩衝液等で希釈して本発明の方法に使用することができる。

【0042】

更に本発明は、本発明の診断方法のための試薬を提供する。すなわち本発明は、ChM1Lタンパク質のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する抗体からなる、血管新生を伴う疾患及びChM1Lの活性が減弱あるいは亢進した疾患、例えば癌、関節リウマチ及び腱炎の診断用試薬に関する。

【0043】

本発明の試薬を構成する抗体は、アッセイフォーマットに応じて適当な標識を結合することができる。あるいは本発明の試薬を構成する抗体は、アッセイフォーマットに応じて適当な支持体に固定化しておくこともできる。また本発明の試薬は、前記抗体の他に、検査や保存に必要な付加的な要素と組み合わせて診断用キットとすることもできる。キットを構成することができる付加的な要素としては、試薬や生体試料を希釈するための緩衝液、陽性対照、陰性対照、標識を測定するための基質、反応容器、アッセイプロトコルを記載した指示書等があげられる。これらの要素は必要に応じて予め混合しておくこともできる。また、必要に応じて、保存剤や防腐剤を各要素に加えることができる。

【0044】

本発明における疾患の診断とは、例えば以下のような診断が含まれる。血管新生を伴う疾患及びChM1Lの活性が減弱あるいは亢進した疾患、例えば癌、関節リウマチ及び腱炎において、一般的な検査では、判定できない患者であっても、本発明に基づく検査を行えば腱炎の患者であるか否かを容易に判定することができる。より具体的には、腱炎が疑われる症状を示す患者において、ChM1Lタンパク質の発現の上昇もしくは低下は、その症状の原因が腱炎である可能性が高いことを示している。

【0045】

あるいは、血管新生を伴う疾患及びChM1Lの活性が減弱あるいは亢進した疾患、例えば癌、関節リウマチ及び腱炎が改善に向かっているのかどうかを判断するための検査が可能となる。つまり、腱炎に対する治療効果の判定に有用である。より具体的には、腱炎が疑

われる症状を示す患者において、ChM1Lタンパク質の発現の上昇もしくは低下は、腱炎がさらに進行もしくは改善している可能性が高いことを示している。

【0046】

さらに、発現レベルの違いに基づいて、腱炎の重症度を判定することもできる。すなわち、ChM1Lタンパク質の発現の程度は、腱炎の重症度もしくは軽症度に相関する可能性がある。

【0047】

<医薬品>

血管新生を伴う疾患及びChM1Lの活性が減弱あるいは亢進した疾患、例えば癌、関節リウマチ及び腱炎（乾癬、血管腫、糖尿病性網膜症、角膜損傷若しくは角膜移植時の血管新生など）に対する治療薬は、本発明のポリペプチドを有効成分として含み、生理学的に許容される担体、賦活剤、あるいは希釈剤等と混合することによって製造することができる。本発明の治療薬は、症状の改善を目的として、経口あるいは非経口的に投与することができる。

【0048】

経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶液、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型を選択することができる。注射剤には、皮下注射剤、筋肉注射剤、関節腔注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。

【0049】

また、眼科治療における投与剤形としては点眼剤、軟膏、有効成分を含有するコンタクトレンズなどが用いられる。さらに、血管内局所においてはステントや血管内栓塞剤に含有若しくは塗布する形でも使用できる。

【0050】

また、投与すべき治療薬の有効成分がタンパク質からなる場合には、それをコードする遺伝子を遺伝子治療の手法を用いて生体に導入することにより、治療効果を達成することができる。治療効果をもたらすタンパク質をコードする遺伝子を生体に導入し、発現させることによって、疾患を治療する手法は公知である（金田著 日本薬理雑誌 2001年発行 117巻 p299～306）。

【0051】

投与量は、患者の年齢、性別、体重および症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分の種類などにより異なるが、通常成人一人あたり、1回につき0.1mgから500mgの範囲で、好ましくは0.5mgから20mgの範囲で投与することができる。しかし、投与量は種々の条件により変動するため、上記投与量よりも少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を超える投与量が必要な場合もある。

【0052】

以下、実施例をもって本発明をさらに詳しく説明するが、これらの実施例は本発明を制限するものではない。

なお、下記実施例において、各操作は特に明示がない限り、サンプロック、フリッチ、マニアティス著（Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.）モレキュラー クローニング：ア ラボラトリー マニュアル 第2版（Molecular Cloning: a laboratory Manual, 2nd Edn.）（USA）Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989年）に記載の方法により行うか、または、市販の試薬やキットを用いる場合には市販品の指示書に従って使用した。

【実施例】

【0053】

〔実施例1〕 分泌型ChM1Lタンパク質の検出

<方法> ヒトChM1L（アミノ酸1-317）のC末端にFLAGタグが融合したタンパク質をコードするcDNA（配列番号1）をPCR法により増幅し、pCAGGSベクター（Miwa等 ジーン（Gene）（Netherlands）1991年12月15日発行 108巻2号 p193-200）にクローニングした（

pCAGGS-hChM1L-FLAG)。尚、本実施例で述べるFLAGタグ (Sigma) とは、8アミノ酸からなる親水性のマーカープепチド (Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys) である。リポフェクトアミンプラス試薬 (Life technologies) を用いて、製品説明書に従い、pCAGGS及びpCAGGS-hChM1L-FLAGをCOS7細胞及び293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクトしてから約48時間後に培養上清を回収し、抗FLAG M2アガロース (Sigma) で免疫沈降を行った。免疫沈降後のサンプルを15%ゲルでSDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) を行い、ニトロセルロース膜にトランスファーした。一次抗体は抗ChM1Lポリクローナル抗体 (非特許文献6)、二次抗体はhorseradish peroxidaseで標識された抗ウサギIgG抗体 (Dako) を用い、ECLplus試薬 (Amersham pharmacia biotech) により製品説明書に従って発色反応を行った。

【0054】

＜結果＞ 図1に分泌型ChM1LのWestern blot法により検出した結果を示す (レーン1: pCAGGS (COS7細胞)、レーン2: pCAGGS-ChM1L-FLAG (COS7細胞)、レーン3: pCAGGS (293T細胞)、レーン4: pCAGGS-ChM1L-FLAG (293T細胞))。pCAGGS-ChM1L-FLAGをトランスフェクトした細胞では、培養液中に約15kDaの分泌型ChM1Lが存在することが明らかになった。

【0055】

〔実施例2〕 分泌型ChM1Lの精製及びN末端アミノ酸配列の解析

＜方法＞ リポフェクトアミンプラス試薬 (Life technologies) を用いて、製品説明書に従い、pCAGGS-hChM1L-FLAGを293T細胞にトランスフェクトし、約48時間後に培養上清を回収した。抗FLAG M2アガロース (Sigma社) を用いて、アフィニティーカラムを作製し、培養上清をカラムにアプライした。25mM Tris-HCl, 150mM NaCl (pH7.4) でカラムを洗浄後、0.1M グリシン-HCl (pH3.5) を用いて溶出し、1/20容量の1M Tris-HCl (pH9.5) を用いて溶出液を中和した。溶出液を用いて15%ゲルでSDS-PAGEを行い、Sequi-Blot™ PVDF膜 (Bio-Rad) にトランスファーした後、GelCode Bluestain reagent (Pierce) で染色した。約15kDaのバンドを切り出し、pyroglutamate aminopeptidase (Takara) で処理した後、エドマン分解法でN末端アミノ酸配列を解析した。

【0056】

＜結果＞ 分泌型ChM1Lの精製過程の各画分でSDS-PAGEを実施し、GelCode Bluestain reagent (Pierce) で染色した結果を (A) に示す (レーン1: 培養上清、レーン2: カラム素通り画分、レーン3: 洗浄画分、レーン4-11: 溶出画分)。カラムからの溶出画分には、約15kDaのタンパク質が存在することが明らかとなった。15kDaのバンドを切り出して、エドマン分解法で解析したところ、アミノ酸配列を読み取ることができず、N末端がブロックされていると考えられた。pyroglutamate aminopeptidaseで処理した後、N末端アミノ酸配列を解析したところ、ASEEELPという配列であることが判明した。従って、分泌型ChM1Lは、膜結合型ChM1L (317アミノ酸) の237番目から317番目までの81アミノ酸 (配列番号4) で構成されることが判明し、N末端のアミノ酸である237番目のグルタミンはピログルタミン酸に変換されていることが明らかになった (B: ChM1LとChM-Iの切断点の比較を参照)。

【0057】

〔実施例3〕 ChM1Lタンパク質の大腸菌での発現と精製

＜方法＞ ヒト分泌型ChM1L (アミノ酸237-317) のN末端にメチオニン、HisタグおよびFLAGタグが融合したタンパク質をコードするcDNA (配列番号5) をPCR法により増幅し、pETベクター (Novagen) にクローニングした (pET-shChM1L)。pET-shChM1Lを大腸菌Oriami B (DE3) pLysS (Novagen) に形質転換した。大腸菌をLB培地中で1晩培養し、その一部を約3時間再培養した後、最終濃度1mMになるようにisopropyl-1-thio- β -D-galactopyranosideを添加して組換えタンパク質の発現を誘導後、さらに4時間培養した。培養液を5000×gで遠心して大腸菌をペレット化し、6 M Guanidine, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0で可溶化後、遠心分離により不溶性画分を除去し、nickel nitrilotriacetic アガロース (Qiagen) カラムにアプライした。カラムを8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.0

1 M Tris-HCl, pH 8.0で洗浄し、イミダゾール濃度を徐々に上昇させたバッファーでさらに洗浄した後、200 mMイミダゾール入りのバッファーで組換えタンパク質を溶出した。溶出画分をPD-10カラム (Amersham pharmacia biotech) にアプライし、25 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH8.3にバッファー交換した。組換えタンパク質溶液中のエンドトキシンは、Triton X-114を用いてAidaらの方法 (Aida等 ジャーナル・オブ・イミュノロジカル・メソッズ (Journal of Immunological Methods) (Netherlands) 1990年9月14日発行 132巻2号 p 191~195) を一部改変した以下に示す方法により除去した。組換えタンパク質溶液中に、最終濃度が1%になるようにTriton X-114を加えて、氷上で30分、37℃で10分インキュベートした後、2000×g、25℃で10分間遠心し上清を回収した。この上清に最終濃度が1%となるようにTriton X-114を加えて、上記の操作をもう一度繰り返した。PD-10カラムを1% sodium deoxycholateで洗浄してカラム内のエンドトキシンを除去した後、ポジダイニフィルター (Pole) でエンドトキシンを除去した25 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH8.3に置換した後、組換えChM1Lタンパク質溶液をアプライして残存しているTriton X-114を除去した。エンドトキシン濃度は、Limulus amebocyte lysate assay (Biowhittacker) で測定した。タンパク質濃度は、bovine serum albuminをスタンダードに用いて、BCA protein assay reagent (Pierce) で測定した。精製した組換えChM1Lタンパク質を15%ゲルでSDS-PAGEを行い、GelCode Bluestain reagent (Pierce) で染色した。

【0058】

<結果> 精製した組換えChM1Lタンパク質のSDS-PAGEを実施し、GelCode Bluestain reagent (Pierce) で染色した結果を図3に示す (レーン1: 非還元化 (- 2 mercaptoethanol)、レーン2: 還元化 (+ 2 mercaptoethanol))。精製した組換えChM1Lタンパク質のエンドトキシン濃度は5 EU/mL/mg protein未満であり、収量は15-30 mg/L培養であった。上記の方法により、細胞及び生体に投与可能な組換えChM1Lタンパク質を大量に取得することが可能になった。

【0059】

[実施例4] ChM-Iタンパク質の大腸菌での発現と精製

<方法> ヒトChM-IのN末端にメチオニン、6残基のヒスチジン (Hisタグ) およびFLAGタグが融合したタンパク質をコードするcDNA (配列番号7) をPCR法により増幅し、pETベクター (Novagen) にクローニングした (pET-shChM-I)。pET-shChM-Iを大腸菌Origami B (DE3) pLysS (Novagen) に形質転換した。大腸菌をLB培地中で1晩培養し、その一部を約3時間再培養した後、最終濃度1mMになるようにisopropyl- β -D-galactopyranosideを添加して組換えタンパク質の発現を誘導後、さらに4時間培養した。培養液を5000×gで遠心して大腸菌をペレット化し、6 M Guanidine, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0で可溶化後、遠心分離により不溶性画分を除去し、nickel nitrilotriacetic アガロース (Qiagen) カラムにアプライした。カラムを8 M urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0で洗浄し、イミダゾール濃度を徐々に上昇させたバッファーでさらに洗浄した後、200 mMイミダゾール入りのバッファーで組換えタンパク質を溶出した。溶出画分をPD-10カラム (Amersham pharmacia biotech) にアプライし、25 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH8.3にバッファー交換した。組換えタンパク質溶液中のエンドトキシンは、Triton X-114を用いてAidaらの方法 (Aida等 ジャーナル・オブ・イミュノロジカル・メソッズ (Journal of Immunological Methods) (Netherlands) 1990年9月14日発行 132巻2号 p 191~195) を一部改変した以下に示す方法により除去した。組換えタンパク質溶液中に、最終濃度が1%になるようにTriton X-114を加えて、氷上で30分、37℃で10分インキュベートした後、2000×g、25℃で10分間遠心し上清を回収した。この上清に最終濃度が1%となるようにTriton X-114を加えて、上記の操作をもう一度繰り返した。PD-10カラムを1% sodium deoxycholateで洗浄してカラム内のエンドトキシンを除去した後、ポジダイニフィルター (Pole) でエンドトキシンを除去した25 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH8.3に置換した後、組換えChM-Iタンパク質溶液をアプライして残存しているTriton X-114を除去した。エンドトキシン濃度は、Limulus amebocyte lysate assay (Biowhittacker) で測定した。タンパク質濃度は、bovine serum albuminをスタンダードに用いて、BCA pr

rotein assay reagent (Pierce) で測定した。精製した組換えChM-Iタンパク質を15%ゲルでSDS-PAGEを行い、GelCode Bluestain reagent (Pierce) で染色した。

【0060】

＜結果＞ 精製した組換えChM-Iタンパク質のSDS-PAGEを実施し、GelCode Bluestain reagent (Pierce) で染色した結果を図4に示す（レーン1：非還元化（- 2 mercaptoethanol）、レーン2：還元化（+ 2 mercaptoethanol））。精製した組換えChM-Iタンパク質のSDS-PAGEの結果を図4に示す。精製した組換えChM-Iタンパク質のエンドトキシン濃度は5 EU/mL/mg protein未満であり、収量は10-20 mg/L培養であった。上記のChM1Lと同じ方法により、組換えChM-Iタンパク質を大量に取得することが可能になった。

【0061】

〔実施例5〕 血管内皮細胞の増殖阻害作用の解析

＜方法＞ 細胞増殖の解析はDNA合成（細胞内へのBrdUの取り込み）を指標にして行った。細胞を96穴プレートに3,000個/wellの濃度で培養し、その後、血清非存在下で24時間インキュベートした（37℃、CO₂存在下）。各ウェルを洗浄後、様々な濃度のChM1Lの存在下、10 ng/mL FGF-2、10ng/mL VEGF、10ng/mL HGF、10% FBSで24時間（図5B - 5E）もしくは48時間（図5A）、細胞を刺激した。BrdUは培養の最後の3時間、細胞に取り込ませた。

【0062】

＜結果＞ ChM1Lの各種細胞に対するDNA合成阻害活性を図5に示す。図5のAは、ChM1LがHUVECsの各種刺激によるDNA合成を阻害すること、Bは、ChM1LがHUVECsのFGF-2刺激によるDNA合成を濃度依存的に阻害すること、Cは、ChM1LがHMVECsのDNA合成を阻害すること、Dは、ChM1LがNHDFsのDNA合成を阻害しないこと、Eは、ChM1LがMRC-5のDNA合成を阻害しないことを示す。各値は、平均値±標準偏差を示し、「**」及び「***」は、コントロール（ビークル）値に対する有意差（**はP < 0.01、***はP < 0.001）を示す。

【0063】

100 μ g/mLのChM1Lはヒト臍帯静脈内皮細胞（human umbilical vein endothelial cells：HUVECs、Clonetics）におけるFGF-2、VEGF、HGF、FBS依存的なDNA合成をほぼ完全に抑制した（図5A）。また、ChM1LによるFGF-2依存的なDNA合成の抑制は濃度依存的に観察された（図5B）。ChM1LによるDNA合成の阻害は他の血管内皮細胞（human dermal micro vascular endothelial cells; HMVECs）でも見られた（図5C）。しかしながら、ヒト線維芽細胞であるnormal human dermal fibroblasts (NHDFs)、MRC-5 cells (normal lung fibroblasts) では、100 μ g/mLのChM1LによるDNA合成の阻害は観察されなかった（図5D及び5E）。これらのことから、ChM1Lは血管内皮細胞特異的にDNA合成を阻害すると考えられた。

【0064】

〔実施例6〕 血管内皮細胞の管腔形成阻害作用の解析

＜方法＞ 24穴プレートに、Growth factor reduced Matrigel (Becton Dickinson) を320 μ L/ウェルで加えて、37℃で30分間インキュベートした。EGM-2培地（Clonetics）をEBM-2培地（Clonetics）で1/8に希釈した培地を用いて、50,000 個/mLのHUVECsを含む細胞懸濁液を調製した。細胞懸濁液1mL（50,000個）に100, 25, 12.5 μ g/mLの組換えChM1Lあるいはバッファー（25 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH8.3）を加えて、Growth factor reduced Matrigelでコートした24穴プレートにシーディングし、6時間後に管腔形成を観察して写真を撮影した。

【0065】

＜結果＞ ChM1LがHUVECsの管腔形成を阻害することを図6に示す。Aは、25 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH8.3を、BはChM1L 100 μ g/mLを、CはChM1L 25 μ g/mLを、DはChM1L 12.5 μ g/mLの場合を、スケールバーは 100 μ mを示す。ChM1Lは、HUVECsの管腔形成を濃度依存的に阻害することが明らかになった。

【0066】

〔実施例7〕 血管内皮細胞の遊走阻害作用の解析

＜方法＞ 血管内皮細胞の遊走実験は $1\mu\text{g/mL}$ のvitronectin (Sigma) でフィルターの上層および下層をコートしたポアサイズ 8mm のtranswell (Coster)を用いて行った。すなわち、24穴プレートの各ウェルに0.1%の血清を含む培地、 10ng/mL のVEGFを含む培地、もしくは 10ng/mL のFGF-2を含む培地を $600\mu\text{L}$ ずつ加えた。プレートの各ウェルにフィルターを装着後、24時間血清非存在下で培養したヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells: HUVECs, Clonetics) を様々な濃度のChM1Lが存在する培地に懸濁し、50,000個/wellとなるようにフィルターの上層に添加した。 37°C 、 CO_2 存在下で細胞を4時間インキュベートした後、フィルターを取り外し、メタノールで細胞を固定した。Diff-Quick染色液 (Dade Behring) でフィルターを染色後、綿棒でフィルターの上層の細胞を除去した。フィルターをカッターで切り取り、スライドガラスに封入後、顕微鏡下で遊走細胞数を数えた。遊走細胞数は、1視野あたりの細胞数として求めた。

【0067】

＜結果＞ ChM1LがHUVECsの遊走を阻害することを図7に示す。Aは、ChM1LがHUVECsのVEGFに対する遊走を阻害すること、BはChM1LがHUVECsのFGF-2に対する遊走を濃度依存的に阻害することを示す。各値は平均値±標準偏差を示し、コントロール (ピークル) 値に対する有意差を示す (*は $P < 0.05$ 、**は $P < 0.01$)。遊走実験の結果、ChM1LによりVEGF、FGF-2に対する遊走の阻害が観察された (図7A及び7B)。この遊走阻害は、 $100\mu\text{g/mL}$ ChM1Lで最も強く、濃度依存性が見られた。すなわち、ChM1Lは血管内皮細胞の遊走を阻害することが明らかとなった。

【0068】

〔実施例8〕 血管内皮細胞の接着阻害作用の解析

＜方法＞ 96穴プレートを $1\mu\text{g/mL}$ のfibronectin (Sigma)、 $1\mu\text{g/mL}$ のvitronectin (Sigma)、 $1\mu\text{g/mL}$ のtype I collagen (Sigma) でコートした。各ウェルを洗浄後、1% BSAを含むPBSでブロッキングを行った。HUVECsを1,000,000個/mLの濃度で血清を含まない培地に懸濁し、calcein AM (Molecular Probes) で蛍光ラベルした。細胞を洗浄後、100,000個/wellとなるように各ウェルに添加し、 $100\mu\text{g/mL}$ の濃度になるようにChM1Lを添加した。 37°C 、 CO_2 存在下で細胞を1時間インキュベートした後、各ウェルを洗浄し、蛍光プレートリーダーで蛍光強度を測定した。

【0069】

＜結果＞ 図8にChM1LがHUVECsのvitronectinに対する接着を阻害することを示す。各値は平均値±標準偏差を、**はコントロール (ピークル) 値に対する有意差を示す (**は $P < 0.01$)。ChM1LによりHUVECsのvitronectinに対する接着阻害が観察された。一方、fibronectin、type I collagenに対する接着には影響は見られなかった。すなわち、ChM1Lはvitronectinに対する細胞の接着を阻害することが明らかとなった。また、本実験は、組換えChM1Lタンパク質の活性を簡便に調べることができる方法であることが明らかとなった。さらに、vitronectinは、Integrin $\alpha_v\beta_{III}$ と結合することが知られていることから、ChM1LはvitronectinとIntegrin $\alpha_v\beta_{III}$ の相互作用を抑制することが明らかになった。また、ChM1LがIntegrin $\alpha_v\beta_{III}$ と結合して、その活性を制御することにより血管新生阻害作用を発現しているというメカニズムが推察された。

【0070】

〔実施例9〕 血管内皮細胞の細胞周期に関する解析

＜方法＞ 細胞周期の解析は、flow cytometerにより細胞のDNA量をモニターすることによって行った。細胞はM期→G1期→S期→G2期→(M期) と規則的に移行していくため、DNA量を調べることによって細胞周期のどの段階にいるのか同定できる。HUVECsを10 cm dishに1,000,000 個/ウェルの濃度で培養し、その後、血清非存在下で24時間インキュベートした (37°C 、 CO_2 存在下)。洗浄後、 $100\mu\text{g/mL}$ のChM1Lの存在下、ECM-2培地で24時間、細胞を刺激した。Triton-X100、RNaseで細胞を処理した後、PI (propidium iodide) で染色を行い、flow cytometerにより解析を行った。

【0071】

＜結果＞ ECM-2培地のみで刺激した場合 (図9A) と比べて、ECM-2培地およびChM1Lで

刺激した条件では、G1期の細胞数が増加し、S期およびG2/M期の細胞数が減少していた（図9B）。この結果は、G1期の細胞がS期に移行していないことを示している。したがって、HUVECsはChM1Lの作用により細胞周期のG1期で停止することが示唆された（G1 arrest）。

【0072】

【実施例10】 血管内皮細胞におけるマトリックスメタロプロテアーゼ（MMPs）の産生に関する解析

＜方法＞ HUVECsを24穴プレートに培養し、その後、血清非存在下で24時間インキュベートした（37℃、CO₂存在下）。洗浄後、100 μg/mLのChM1Lの存在下、未刺激、もしくは10 ng/mL TNF-αで24時間、細胞を刺激した。Total RNAはRNeasy Mini Kit（Qiagen）およびDNase Iを用いて抽出し、Omniscript RT Kit（Qiagen）を用いた逆転写反応によりcDNAを合成した。real-time PCRは、センスプライマー、アンチセンスプライマーをそれぞれ0.1 μM、5 μLの2×SYBR Green PCR Master Mix（Applied Biosystems）、2 μLのcDNAを含む総量10 μLの反応液より行った。反応条件としては、1）変性（95℃で15秒間）、2）アニーリングおよび伸長反応（60℃で1分間）のサイクルを行った。増幅されたPCR産物量の定量は、増幅されたPCR産物（二本鎖DNA）に結合したSYBR Greenの蛍光シグナル強度をPCRサイクル毎に経時的に測定し、サイクル数に対するPCR産物の増幅曲線を作成後、この増幅曲線と任意の閾値（通常、増幅曲線の指数増幅領域の midpoint 付近を選択する）の交わる Threshold cycle (Ct) 値を算出することにより行った。内部標準である18Sに対する target mRNA の相対的な発現量は、計算式 $2^{-(\text{target の Ct} - 18\text{S の Ct})}$ より算出した。

【0073】

＜結果＞ MMP-2、MT1-MMP mRNAの発現について解析した。図10にChM1LのHUVECsにおけるマトリックスメタロプロテアーゼのmRNAの発現に対する影響を示す。AはChM1LがMMP-2 mRNAの発現を抑制することを、BはChM1LがMT1-MMP mRNAの発現を抑制することを示す。尚、各値は平均値±標準偏差を、*および**はコントロール（ビークル）値に対する有意差（*は、P < 0.05、**はP < 0.01）を示す。

【0074】

その結果、未刺激、TNF-α刺激のいずれにおいてもChM1LによりMMP-2、MT1-MMP mRNAの発現抑制が見られた（図10A及びB）。MMP-2とMMP-9は基底膜破壊に深く関わるMMPであり、基底膜の主要成分であるIV型コラーゲンを強く分解する。また、MT1-MMPは細胞膜上で前駆体MMP-2を活性化型のMMPに変換するだけでなく、自ら細胞外マトリックスを分解する。したがって、今回のChM1Lの作用によりMMP-2、MT1-MMP mRNAの発現が抑制された結果は、血管新生の際の基底膜破壊をChM1Lが抑制する可能性を示唆している。

【0075】

【実施例11】 FGF-2誘発スポンジ血管新生モデルにおけるin vivo血管新生阻害作用の解析

＜方法＞ ChM1Lのin vivoでの血管新生抑制作用をFGF-2誘発スポンジ血管新生モデル（Br J Pharmacol. 2000, 399, 2-3, 233-237）を用いて検討した。雄性SDラット（7週令）にCircular sponge disk（5 mm thick × 15 mm diameter）を背部側皮下に移植し、翌日から1日1回3日間、ヒト組換えFGF-2（500ng/50 μL/site）をsponge内に投与して血管新生を誘導した。ChM1L（5 μg/50 μL/site）は1日1回3日間sponge内に投与した。4日目のsponge及び周辺組織を摘出し、肉眼観察及び組織学的な検討を実施した。

【0076】

＜結果＞ FGF-2投与によりスポンジ周囲に肉芽組織の形成および肉芽組織中への血管新生が観察され、ChM1Lは本モデルにおける肉芽組織の形成および血管新生を顕著に抑制した（図11）。本モデルでは移植初期に活発な炎症が観察され、スポンジ周囲での肉芽組織の増殖および血管新生が観察される。したがって、ChM1Lは増殖性炎症および肉芽組織の増殖、血管新生を抑制することが示唆された。

【0077】

【実施例12】 破骨細胞形成抑制作用の解析（M-CSF依存的な骨髄マクロファージ

を用いた検討)

<方法> M-CSF (Macrophage colony stimulating factor) 依存性の骨髄マクロファージを用いた破骨細胞の形成は、東らの方法 (東等 ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー (The Journal of Biological Chemistry) (USA) 2000年2月18日発行 275巻7号 p 4858~4864) を一部改変して実施した。7-8週令の雄ddYマウス (日本エスエルシー) の大腿骨及び脛骨より骨髄細胞を取り出し、赤血球をバーストした後、 α -MEM, 10% FBS, 100 ng/mL ヒトM-CSF (Pepro-Tech EC Ltd) を含む培地で培養し、2回継代培養を行い、M-CSF依存的に増殖する骨髄由来のマクロファージを得た。この細胞を48ウェルプレートに10,000個/ウェルで撒きこみ、約6時間後 (生着確認後) に、100 ng/mL ヒトM-CSF、50 ng/mL ヒトsRANKL (可溶性RANK ligand, Pepro-Tech EC Ltd) 及びChM1LあるいはChM-Iを添加した。5日後に酒石酸抵抗性フォスファターゼ (TRAP) 染色を行った。

【0078】

<結果> ChM1L及びChM-Iは、TRAP陽性の破骨細胞の形成を顕著に抑制した (図12)。

【0079】

[実施例13] 破骨細胞形成抑制作用の解析 (骨髄細胞培養系を用いた検討)

<方法> 9-10週令の雄ddYマウス (日本エスエルシー) の大腿骨及び脛骨より骨髄細胞を取り出し、赤血球をバーストした後、 α -MEM, 10% FBSを含む培地に懸濁し、48ウェルプレートに500,000個/ウェルで撒きこみ、24時間後に、1,25(OH) $_2$ D $_3$ 及びChM1LあるいはChM-Iを添加した。8日後にTRAP染色を行った。

【0080】

<結果> 図13にChM1L及びChM-Iが、骨髄細胞からの破骨細胞形成を抑制することを示す。Aは1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-8} M) + Vehicle、Bは1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-8} M) + ChM1L 10 μ g/mL、Cは1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-8} M) + ChM1L 100 μ g/mL、Dは1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-8} M) + ChM-I 10 μ g/mL、Eは1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10^{-8} M) + ChM-I 25 μ g/mLを示す。結果、ChM1L及びChM-Iは、TRAP陽性の破骨細胞の形成を顕著に抑制した (図13)。

【0081】

[実施例14] 破骨細胞形成抑制作用のメカニズム解析

<方法> M-CSF依存性の骨髄マクロファージ細胞を96ウェルプレートに10,000個/ウェルで撒きこみ、約6時間後 (生着確認後) に、100 ng/mL ヒトM-CSF、50 ng/mL ヒトsRANKL (可溶性RANK ligand, Pepro-Tech EC Ltd) 及びChM1Lを添加した。ChM1Lは、Day0-5、Day0-3、Day3-5の3通りの期間で処理した。5日後に酒石酸抵抗性フォスファターゼ (TRAP) 染色により破骨細胞を同定し、形成数を検討した。ChM1L処理前、処理後1、3、5日に培地を取り除き、Rneasy Mini Kit (QIAGEN)、Rnase-Free DNase Set (QIAGEN)を用いてtotal RNAを抽出した。つづいて、Omniscrypt RT Kit (QIAGEN)をもちいて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。Real-Time PCRは、SYBRTM Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) 及び以下に示すプライマーを用いてABI PRISMTM 7000 (Applied Biosystems) で実施した。

Primer

Rodent GAPDH primerはABIより購入した。

CTR

F5' -GTGCTCCTCGGGCTGTAGC

R5' -GAGGATTCGGTTCCTGAT

TRAP

F5' -GATCCCTCTGTGCGACATCA

R5' -CCAGGGAGTCTCAGATCCA

c-fms

F5'-TGGCATCTGGCTTAAGGTGAA
R5'-GAATCCGCACCAGCTTGCTA

RANK

F5'-ATGAGTACACGGACCGGCC
R5'-GCTGGATTAGGAGCAGTGAACC

NFATc1

F5'-AGGCTGGTCTTCCGAGTTCA
R5'-ACCGCTGGGAACACTCGAT

【0082】

＜結果＞ M-CSF依存性骨髄細胞を用いてM-CSF、RANKLを作用させた破骨細胞形成系において、ChM1Lを10、25、50 μ g/mLで添加し5日間培養したところ25、50 μ g/mLの用量で破骨細胞形成が著明に抑制された(図14)。また、そのときのmRNAの発現をrealtime RT-PCRで検討したところcalcitonin receptor (CTR)、酒石酸抵抗性フォスファターゼ (TRAP)などの破骨細胞マーカーの発現も抑制されていることが明らかとなった(図15)。また、培養の初期(Day0~3)にChM1Lを作用させると、その後ChM1Lを除いて培養しても破骨細胞が形成されないのに対し、培養後期(Day3~5)に添加した場合は破骨細胞が形成された。これらの結果から、ChM1Lは破骨細胞分化の初期段階に作用するとその後の分化を抑制し、分化がある程度まで進んだ細胞に対しては破骨細胞形成を抑制しないことが明らかになった。

【0083】

【実施例15】 ChM1L投与によるB16F10メラノーマの増殖抑制作用の解析

＜方法＞ C57BL6/Jマウス(オス、6週齢)の背部皮下にB16F10細胞を500,000個/匹で移植して、3日後に腫瘍サイズを測定し群分けを行った。群分けを行った後、1日1回、recombinant human ChM1L (3mg/mL) またはvehicle (25mM HEPES, 0.15M NaCl, pH8.3) を50 μ L/siteで癌細胞周囲の皮下に投与した。癌細胞の大きさを毎日caliperで測定した(Len \times width² \times 0.52)。in vitroでのB16F10細胞の増殖解析はDNA合成(細胞内へのBrdUの取り込み)を指標にして行った。細胞を96穴プレートに3,000個/wellの濃度で培養し、その後、血清非存在下で24時間インキュベートした(37℃、CO₂存在下)。各ウェルを洗浄後、様々な濃度のChM1Lの存在下、10% FBSで24時間細胞を刺激した。BrdUは培養の最後の3時間、細胞に取り込ませた。

【0084】

＜結果＞ ChM1Lはin vivoでB16F10細胞の増殖を抑制した(図16A、C)。一方、in vitroではB16F10細胞の増殖を抑制しなかった(図16B)。これらのことから、ChM1Lは血管新生阻害作用により、in vivoにおけるB16F10細胞の増殖を抑制したと考えられた。

【0085】

【実施例16】 ChM1L投与によるB16F10メラノーマの肺転移抑制作用の解析

＜方法＞ C57BL6/Jマウス(オス、6週齢)にB16F10細胞を50,000個/匹で静脈内投与し、1日1回、recombinant human ChM1L (3mg/mL) またはvehicle (25mM HEPES, 0.15M NaCl, pH8.3) を50 μ L/site (150 μ g/site) で背部皮下に投与した。移植後、21日目に肺を取り出し、顕微鏡下で転移した細胞のコロニー数を数えた。

【0086】

＜結果＞ ChM1LはB16F10細胞の肺転移を抑制した(図17)。尚、各値は平均値 \pm 標準偏差を、***はコントロール(ピークル)値に対する有意差を示す(P < 0.001)。

【0087】

【実施例17】 血管内皮細胞のアポトーシス誘導作用の解析

＜方法＞ アポトーシスの初期において細胞膜構造が変化し、正常細胞では脂質二重膜の内側に局在するホスファチジルセリンが細胞膜の外側に露出することが知られている。したがって、アポトーシス誘導作用の解析はホスファチジルセリンに Annexin V が結合

することを利用した手法を用いて行った。具体的には、human dermal micro vascular endothelial cells (HMVECs) を6穴プレートに100,000個/wellの濃度で培養し、その後、血清非存在下で24時間インキュベートした(37℃、CO₂存在下)。各ウェルを洗浄後、様々な濃度のChM1Lの存在下、10 ng/mL FGF-2で細胞を刺激した。48時間後、細胞をトリプシン-EDTAで剥離し、Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (BioVision)で染色後、フローサイトメーターにより解析した。

【0088】

＜結果＞ ChM1LはHMVECsにおけるアポトーシスを濃度依存的に誘導した。これらのことから、ChM1Lは血管内皮細胞にアポトーシスを誘導する作用を持つと考えられた(図18)。尚、各値は平均値±標準偏差を、***はコントロール(ピークル)値に対する有意差を示す(P < 0.001)。

【0089】

【実施例18】 生体組織における可溶性ChM1Lタンパク質の検出

＜方法＞ DBA1/Jマウス(オス、13週齢)からアキレス腱、眼球、腎臓、肝臓を取り出し、液体窒素で凍結した後、乳棒及び乳鉢で粉碎した。粉碎した組織を4M Guanidine, 50 mM sodium acetate, pH5.8及びホモジナイザーで可溶化、超音波処理した後、15,000rpm、10分間遠心分離を行った。遠心後の上清に9倍量の100%エタノールを加え、-80℃で5分間放置した後、15,000rpmで10分間遠心分離を行った。上清を捨て、沈渣を50mM sodium acetate, pH5.8で懸濁した後、9倍量の100%エタノールを加えてさらに15,000rpmで10分間遠心分離を行った。沈渣を8M urea, 20mM Tris, pH8.0で可溶化した。タンパク質濃度は、bovine serum albuminをスタンダードに用いて、BCA protein assay reagent (Pierce)で測定した。サンプルを35 µg/laneで10-20%ゲルを用いてSDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)を行い、ニトロセルロース膜にトランスファーした。一次抗体は抗ChM1Lポリクローナル抗体(非特許文献6)、二次抗体はhorseradish peroxidaseで標識された抗ウサギIgG抗体(Dako)を用い、ECLplus試薬(Amersham pharmacia biotech)により製品説明書に従って発色反応を行った。

【0090】

＜結果＞ 腱及び眼球には約40kDaの膜結合型ChM1Lタンパク質が、さらに腱では約14kDaの可溶性ChM1Lタンパク質が存在することが明らかになった(図19)。以上の結果により、可溶性のChM1Lタンパク質が生理的に存在することが初めて明らかになった。

【図面の簡単な説明】

【0091】

【図1】 分泌型ChM1LをWestern blot法により検出した結果を示す。

【図2】 分泌型ChM1Lの精製過程の各画分でSDS-PAGEを実施し、GelCode Bluestain reagent (Pierce)で染色した結果(A)、ChM1LとChM-Iの切断点の比較(B)を示す。

【図3】 精製した組換えChM1Lタンパク質のSDS-PAGEを実施し、GelCode Bluestain reagent (Pierce)で染色した結果を示す。

【図4】 精製した組換えChM-Iタンパク質のSDS-PAGEを実施し、GelCode Bluestain reagent (Pierce)で染色した結果を示す。

【図5】 ChM1Lの各種細胞に対するDNA合成阻害活性を示す。

【図6】 ChM1LがHUVECsの管腔形成を阻害することを示す。

【図7】 ChM1LがHUVECsの遊走を阻害することを示す。

【図8】 ChM1LがHUVECsのvitronectinに対する接着を阻害することを示す。

【図9】 ChM1LがHUVECsの細胞周期をG1期で停止させることを示す(A: 25 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH8.3、B: ChM1L 100 µg/mL)。

【図10】 ChM1LのHUVECsにおけるマトリックスメタロプロテアーゼのmRNAの発現に対する影響を示す。

【図11】 ChM1LがFGF-2誘発肉芽腫形成モデルにおいてin vivoで血管新生を阻害することを示す(A: 25 mM HEPES, 0.15 M NaCl, pH8.3、B: ChM1L 100 µg/mL)。

【図 1 2】 ChM1L 及び ChM-I が、M-CSF 依存性骨髄マクロファージからの破骨細胞の形成を抑制することを示す (A: M-CSF 100 ng/mL、B: M-CSF 100 ng/mL + RANKL 50 ng/mL + Vehicle、C: M-CSF 100 ng/mL + RANKL 50 ng/mL + ChM1L 10 μ g/mL、D: M-CSF 100 ng/mL + RANKL 50 ng/mL + ChM1L 100 μ g/mL、E: M-CSF 100 ng/mL + RANKL 50 ng/mL + ChM-I 10 μ g/mL、F: M-CSF 100 ng/mL + RANKL 50 ng/mL + ChM-I 25 μ g/mL)。

【図 1 3】 ChM1L 及び ChM-I が、骨髄細胞からの破骨細胞形成を抑制することを示す (A: 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁸ M) + Vehicle、B: 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁸ M) + ChM1L 10 μ g/mL、C: 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁸ M) + ChM1L 100 μ g/mL、D: 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁸ M) + ChM-I 10 μ g/mL、E: 1,25(OH)₂D₃ (10⁻⁸ M) + ChM-I 25 μ g/mL)。

【図 1 4】 ChM1L は破骨細胞前駆細胞分化の初期に直接作用して分化を抑制し、その抑制作用は不可逆的であることを示す。

【図 1 5】 破骨細胞マーカー遺伝子の発現解析の結果を示す。

【図 1 6】 ChM1L 投与による B16F10 メラノーマの増殖抑制作用の解析結果を示す。ChM1L 投与により in vivo で B16F10 メラノーマの増殖が抑制されることを示す (A, C)。ChM1L は、in vitro で B16F10 メラノーマ細胞の増殖を抑制しないことを示す (B)。

【図 1 7】 ChM1L が B16F10 メラノーマの肺転移を抑制することを示す。

【図 1 8】 ChM1L が血管内皮細胞のアポトーシスを誘導することを示す。

【図 1 9】 腱組織には可溶性の ChM1L が存在することを示す。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Teijin Pharma Limited

<120> New Secretory Protein

<130> P37777

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 978

<212> DNA

<213> human

$\langle 220 \rangle$

<221> CDS

<222> (1)..(951)

<223>

<400> 1

atg gca aag aat cct cca gag aat tgt gaa gac tgt cac att cta aat 48
Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Asp Cys His Ile Leu Asn
1 5 10 15

gca gaa gct ttt aaa tcc aag aaa ata tgt aaa tca ctt aag att tgt 96
Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys
20 25 30

gga ctg gtg ttt ggt atc ctg gcc cta act cta att gtc ctg ttt tgg 144
Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp
35 40 45

ggg agc aag cac ttc tgg ccg gag gta ccc aaa aaa gcc tat gac atg 192
Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Pro Lys Lys Ala Tyr Asp Met
50 55 60

gag cac act ttc tac agc aat gga gag aag aag aag att tac atg gaa 240
Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu
65 70 75 80

att gat cct gtg acc aga act gaa ata ttc aga agc gga aat ggc act 288
Ile Asp Pro Val Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr
85 90 95

gat gaa aca ttg gaa gta cac gac ttt aaa aac gga tac act ggc atc 336
Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile

100	105	110	
tac ttc gtg ggt ctt caa aaa tgt ttt atc aaa act cag att aaa gtg Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val 115 120 125			384
att cct gaa ttt tct gaa cca gaa gag gaa ata gat gag aat gaa gaa Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu 130 135 140			432
att acc aca act ttc ttt gaa cag tca gtg att tgg gtc cca gca gaa Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu 145 150 155 160			480
aag cct att gaa aac cga gat ttt ctt aaa aat tcc aaa att ctg gag Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu 165 170 175			528
att tgt gat aac gtg acc atg tat tgg atc aat ccc act cta ata tca Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ser 180 185 190			576
gtt tct gag tta caa gac ttt gag gag gag gga gaa gat ctt cac ttt Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Glu Gly Glu Asp Leu His Phe 195 200 205			624
cct gcc aac gaa aaa aaa ggg att gaa caa aat gaa cag tgg gtg gtc Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp Val Val 210 215 220			672
cct caa gtg aaa gta gag aag acc cgt cac gcc aga caa gca agt gag Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala Ser Glu 225 230 235 240			720
gaa gaa ctt cca ata aat gac tat act gaa aat gga ata gaa ttt gat Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp 245 250 255			768
ccc atg ctg gat gag aga ggt tat tgt tgt att tac tgc cgt cga ggc Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly 260 265 270			816
aac cgc tat tgc cgc cgc gtc tgt gaa cct tta cta ggc tac tac cca Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro 275 280 285			864
tat cca tac tgc tac caa gga gga cga gtc atc tgt cgt gtc atc atg Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met 290 295 300			912

cct tgt aac tgg tgg gtg gcc cgc atg ctg ggg agg gtc gactacaaag 961
Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val
305 310 315

acgatgacga caagtga 978

<210> 2
<211> 317
<212> PRT
<213> human

<400> 2

Met Ala Lys Asn Pro Pro Glu Asn Cys Glu Asp Cys His Ile Leu Asn
1 5 10 15

Ala Glu Ala Phe Lys Ser Lys Lys Ile Cys Lys Ser Leu Lys Ile Cys
20 25 30

Gly Leu Val Phe Gly Ile Leu Ala Leu Thr Leu Ile Val Leu Phe Trp
35 40 45

Gly Ser Lys His Phe Trp Pro Glu Val Pro Lys Lys Ala Tyr Asp Met
50 55 60

Glu His Thr Phe Tyr Ser Asn Gly Glu Lys Lys Lys Ile Tyr Met Glu
65 70 75 80

Ile Asp Pro Val Thr Arg Thr Glu Ile Phe Arg Ser Gly Asn Gly Thr
85 90 95

Asp Glu Thr Leu Glu Val His Asp Phe Lys Asn Gly Tyr Thr Gly Ile
100 105 110

Tyr Phe Val Gly Leu Gln Lys Cys Phe Ile Lys Thr Gln Ile Lys Val
115 120 125

Ile Pro Glu Phe Ser Glu Pro Glu Glu Glu Ile Asp Glu Asn Glu Glu
130 135 140

Ile Thr Thr Thr Phe Phe Glu Gln Ser Val Ile Trp Val Pro Ala Glu
145 150 155 160

Lys Pro Ile Glu Asn Arg Asp Phe Leu Lys Asn Ser Lys Ile Leu Glu
165 170 175

Ile Cys Asp Asn Val Thr Met Tyr Trp Ile Asn Pro Thr Leu Ile Ser
180 185 190

Val Ser Glu Leu Gln Asp Phe Glu Glu Glu Gly Glu Asp Leu His Phe
195 200 205

Pro Ala Asn Glu Lys Lys Gly Ile Glu Gln Asn Glu Gln Trp Val Val
210 215 220

Pro Gln Val Lys Val Glu Lys Thr Arg His Ala Arg Gln Ala Ser Glu
225 230 235 240

Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp
245 250 255

Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly
260 265 270

Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro
275 280 285

Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg Val Ile Met
290 295 300

Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val
305 310 315

<210> 3
<211> 246
<212> DNA
<213> human

<220>

<223>

50

55

60

Arg Val Ile Met Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg
 65 70 75 80

Val

<210> 5
 <211> 303
 <212> DNA
 <213> human

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(303)
 <223>

<400> 5
 atg cac cat cat cat cat cat gat atc gac tac aaa gac gat gac gac 48
 Met His His His His His His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 1 5 10 15

aag tcg cga caa gca agt gag gaa gaa ctt cca ata aat gac tat act 96
 Lys Ser Arg Gln Ala Ser Glu Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr
 20 25 30

gaa aat gga ata gaa ttt gat ccc atg ctg gat gag aga ggt tat tgt 144
 Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys
 35 40 45

tgt att tac tgc cgt cga ggc aac cgc tat tgc cgc cgc gtc tgt gaa 192
 Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu
 50 55 60

cct tta cta ggc tac tac cca tat cca tac tgc tac caa gga gga cga 240
 Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg
 65 70 75 80

gtc atc tgt cgt gtc atc atg cct tgt aac tgg tgg gtg gcc cgc atg 288
 Val Ile Cys Arg Val Ile Met Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met
 85 90 95

ctg ggg agg gtc taa 303
 Leu Gly Arg Val
 100

<210> 6
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> human

<400> 6

Met His His His His His His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 1 5 10 15

Lys Ser Arg Gln Ala Ser Glu Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr
 20 25 30

Glu Asn Gly Ile Glu Phe Asp Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys
 35 40 45

Cys Ile Tyr Cys Arg Arg Gly Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu
 50 55 60

Pro Leu Leu Gly Tyr Tyr Pro Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg
 65 70 75 80

Val Ile Cys Arg Val Ile Met Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met
 85 90 95

Leu Gly Arg Val
 100

<210> 7
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> human

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(420)
 <223>

<400> 7
 atg cac cat cat cat cat cat gat atc gac tac aaa gac gat gac gac 48
 Met His His His His His His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 1 5 10 15

aag tcg cga gaa gtg gta aga aaa att gtt cca act acc aca aaa aga 96
 Lys Ser Arg Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr Thr Lys Arg
 20 25 30

cca cac agt gga cca cgg agc aac cca ggc gct gga aga ctg aat aat 144
 Pro His Ser Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg Leu Asn Asn
 35 40 45

gaa acc aga ccc agt gtt caa gag gac tca caa gcc ttc aat cct gat 192
 Glu Thr Arg Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe Asn Pro Asp
 50 55 60

aat cct tat cat cag cag gaa ggg gaa agc atg aca ttc gac cct aga 240
 Asn Pro Tyr His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe Asp Pro Arg
 65 70 75 80

ctg gat cac gaa gga atc tgt tgt ata gaa tgt agg cgg agc tac acc 288
 Leu Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg Ser Tyr Thr
 85 90 95

cac tgc cag aag atc tgt gaa ccc ctg ggg ggc tat tac cca tgg cct 336
 His Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr Pro Trp Pro
 100 105 110

tat aat tat caa ggc tgc cgt tcg gcc tgc aga gtc atc atg cca tgt 384
 Tyr Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile Met Pro Cys
 115 120 125

agc tgg tgg gtg gcc cgt atc ttg ggc atg gtg tga 420
 Ser Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val
 130 135

<210> 8
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> human

<400> 8

Met His His His His His His Asp Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp
 1 5 10 15

Lys Ser Arg Glu Val Val Arg Lys Ile Val Pro Thr Thr Thr Lys Arg
 20 25 30

Pro His Ser Gly Pro Arg Ser Asn Pro Gly Ala Gly Arg Leu Asn Asn

35

40

45

Glu Thr Arg Pro Ser Val Gln Glu Asp Ser Gln Ala Phe Asn Pro Asp
 50 55 60

Asn Pro Tyr His Gln Gln Glu Gly Glu Ser Met Thr Phe Asp Pro Arg
 65 70 75 80

Leu Asp His Glu Gly Ile Cys Cys Ile Glu Cys Arg Arg Ser Tyr Thr
 85 90 95

His Cys Gln Lys Ile Cys Glu Pro Leu Gly Gly Tyr Tyr Pro Trp Pro
 100 105 110

Tyr Asn Tyr Gln Gly Cys Arg Ser Ala Cys Arg Val Ile Met Pro Cys
 115 120 125

Ser Trp Trp Val Ala Arg Ile Leu Gly Met Val
 130 135

<210> 9
 <211> 80
 <212> PRT
 <213> human

<400> 9

Ala Ser Glu Glu Glu Leu Pro Ile Asn Asp Tyr Thr Glu Asn Gly Ile
 1 5 10 15

Glu Phe Asp Pro Met Leu Asp Glu Arg Gly Tyr Cys Cys Ile Tyr Cys
 20 25 30

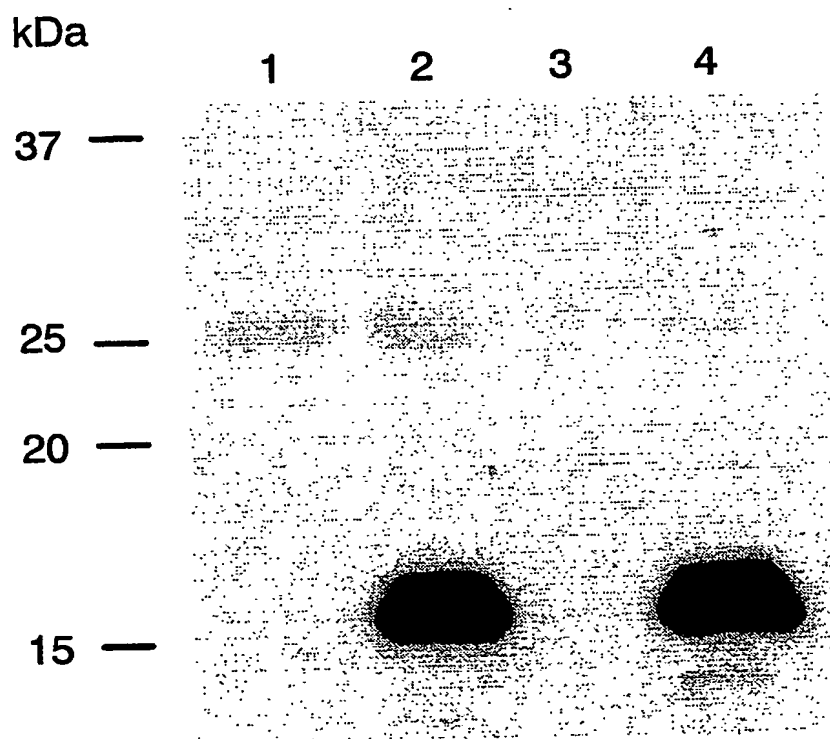
Arg Arg Gly Asn Arg Tyr Cys Arg Arg Val Cys Glu Pro Leu Leu Gly
 35 40 45

Tyr Tyr Pro Tyr Pro Tyr Cys Tyr Gln Gly Gly Arg Val Ile Cys Arg
 50 55 60

Val Ile Met Pro Cys Asn Trp Trp Val Ala Arg Met Leu Gly Arg Val
65 70 75 80

【書類名】 図面
【図 1】

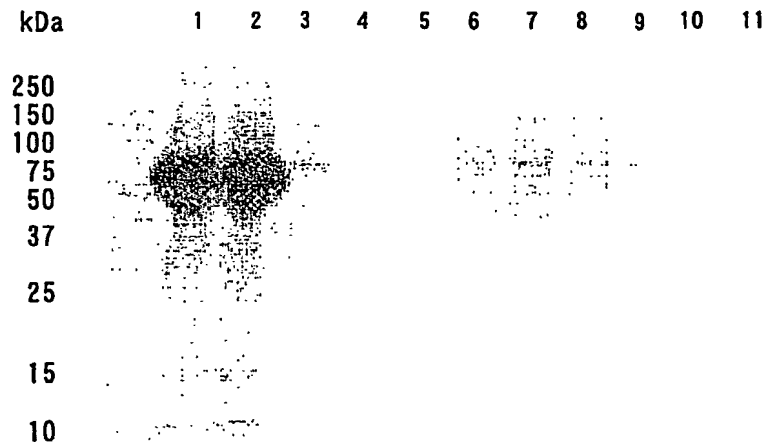
図1 分泌型ChM1LのWestern blot法による同定



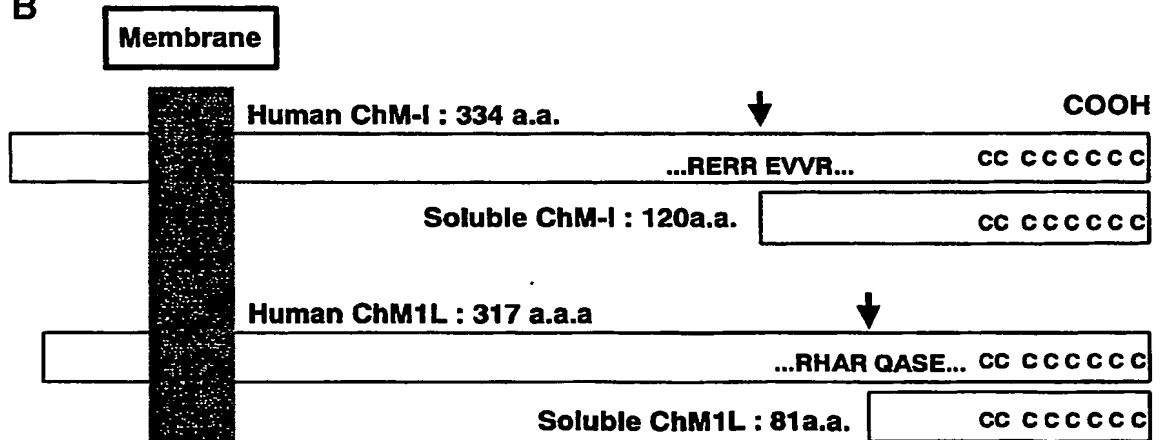
【図 2】

図2 分泌型ChM1Lの精製

A

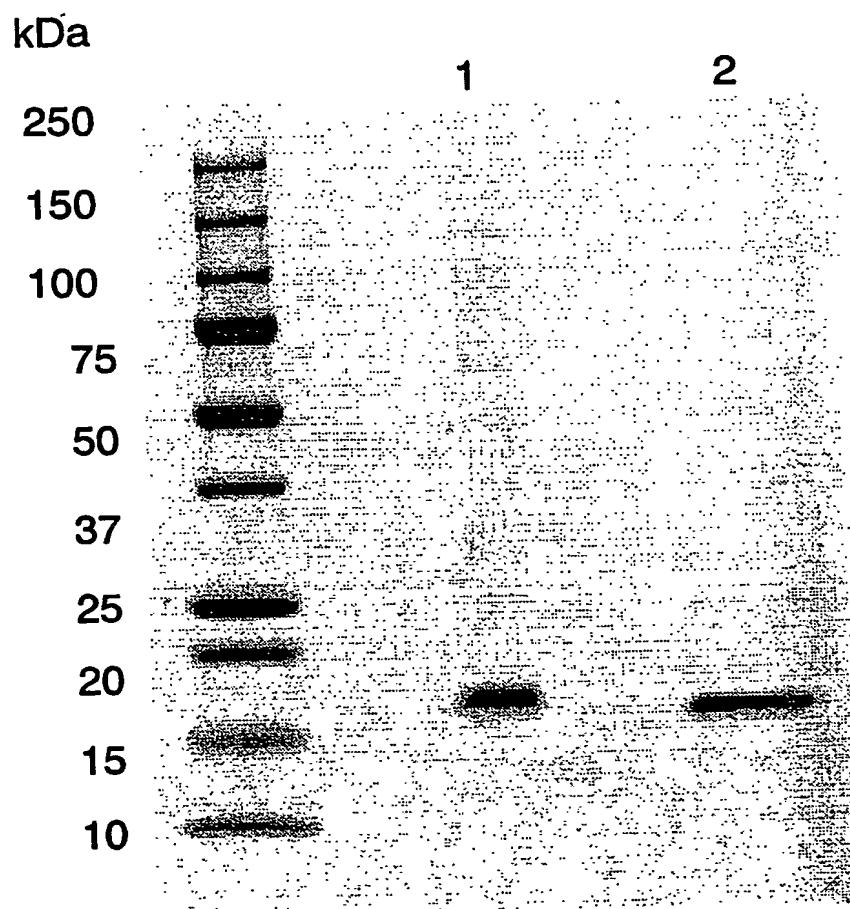


B



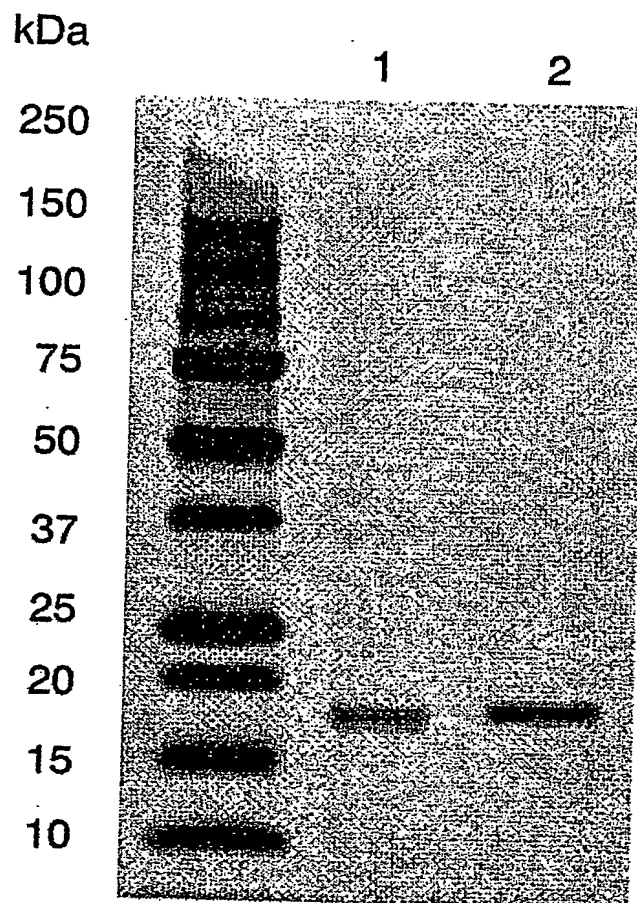
【図3】

図3 精製組換えChM1Lタンパク質



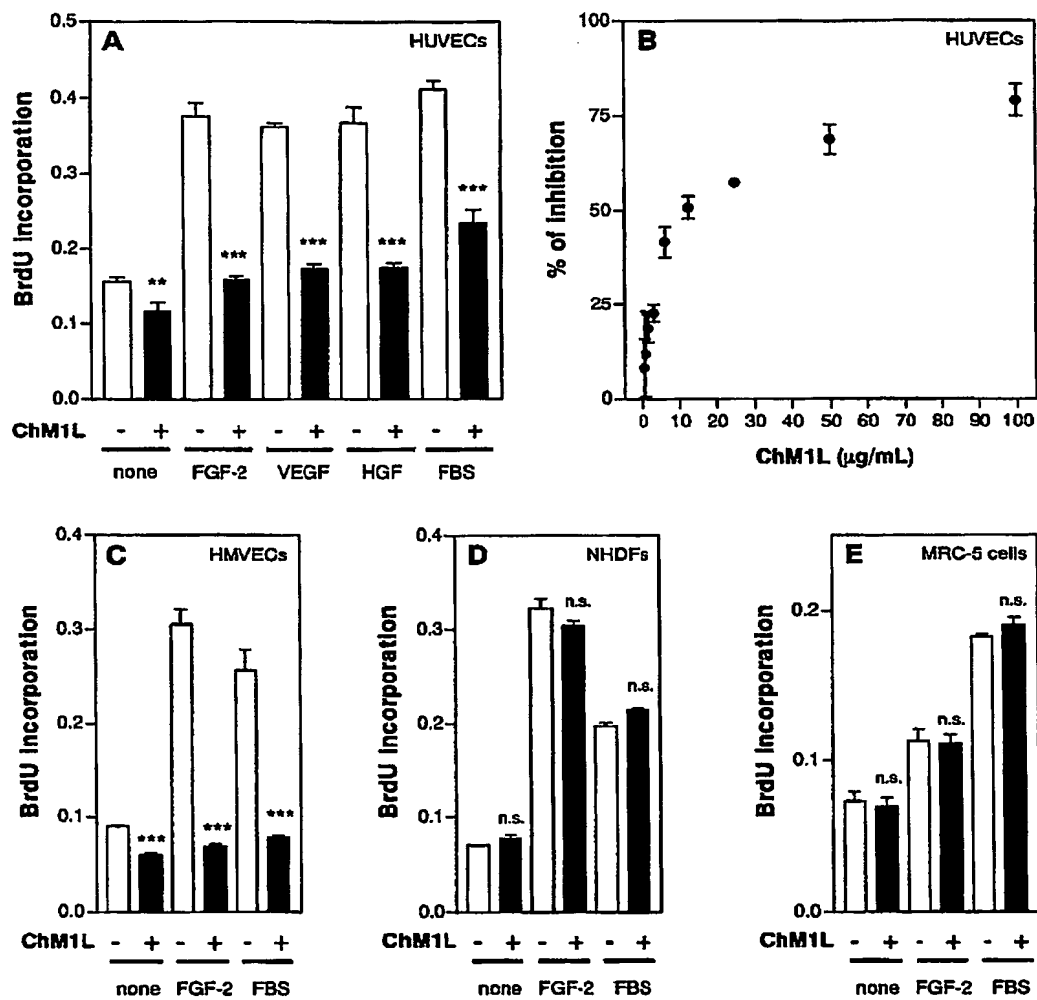
【図 4】

図4 精製組換えChM-Iタンパク質



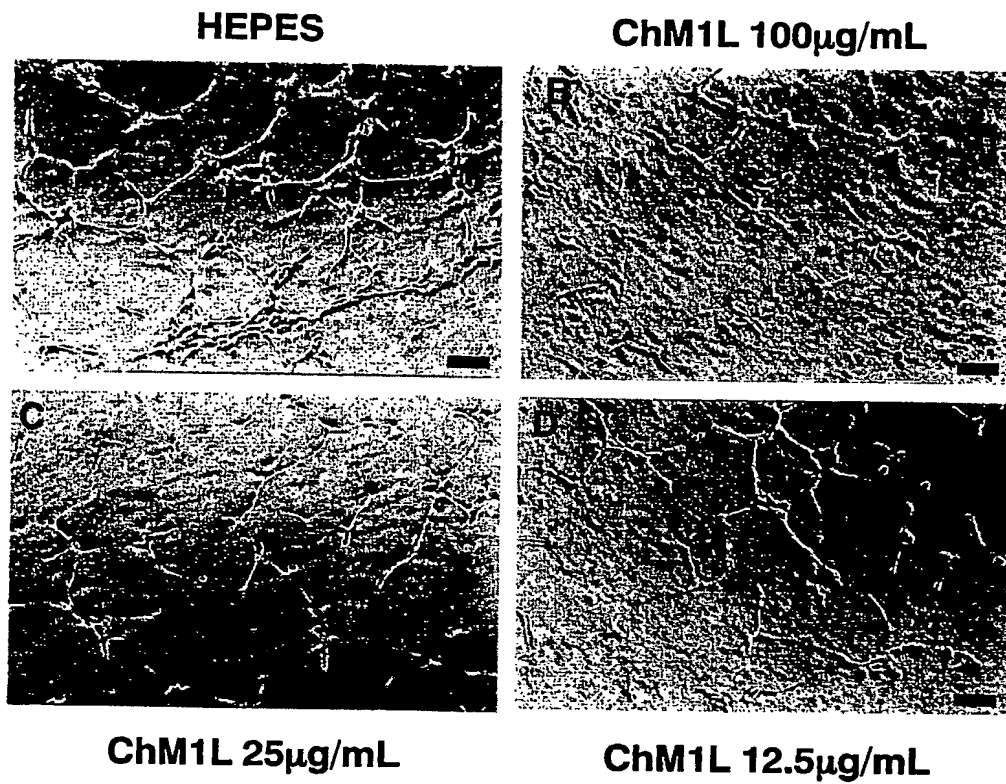
【図5】

図5 血管内皮細胞の細胞増殖阻害活性の解析



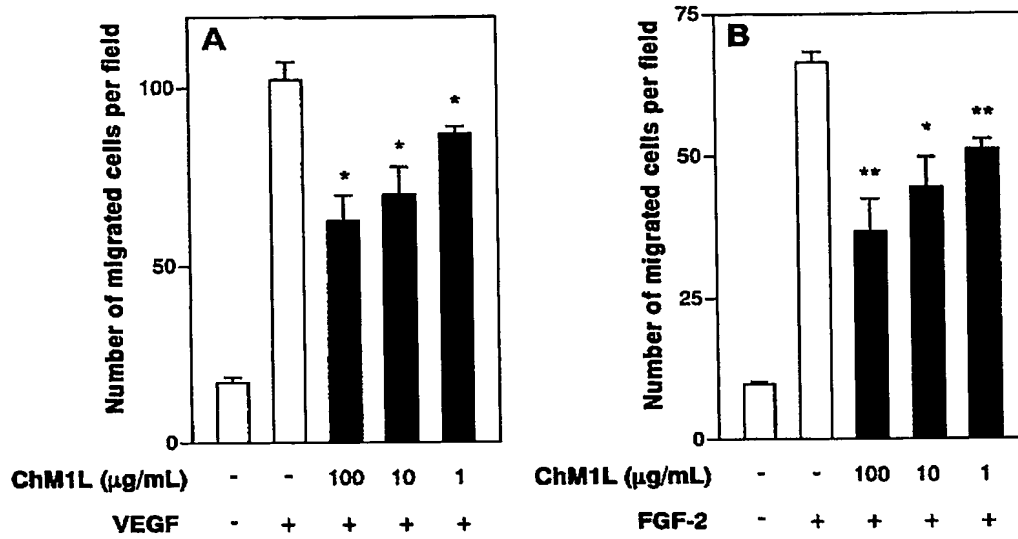
【図 6】

図6 血管内皮細胞の管腔形成阻害作用の解析



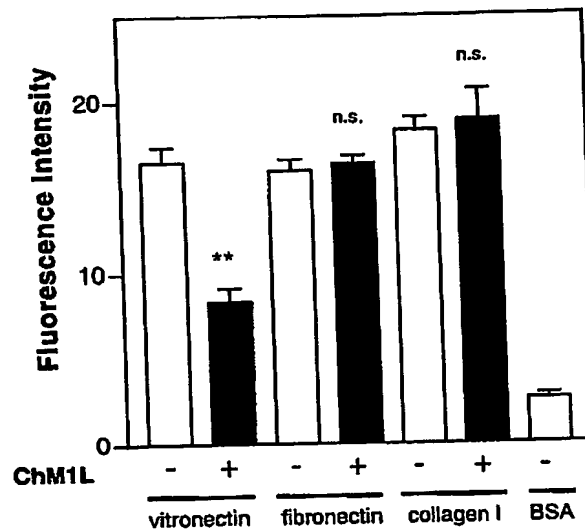
【図 7】

図7 血管内皮細胞の遊走阻害作用の解析



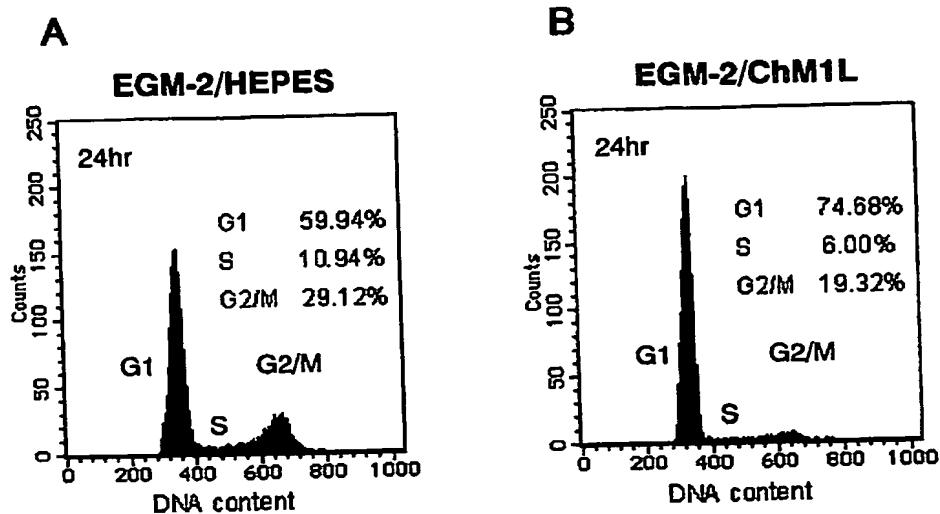
【図 8】

図8 血管内皮細胞の接着阻害作用の解析



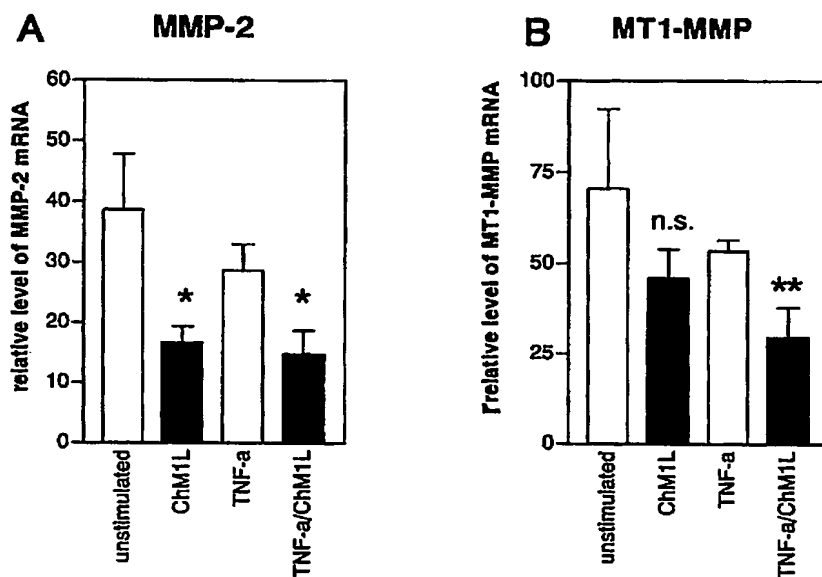
【図 9】

図9 細胞周期に関する解析



【図10】

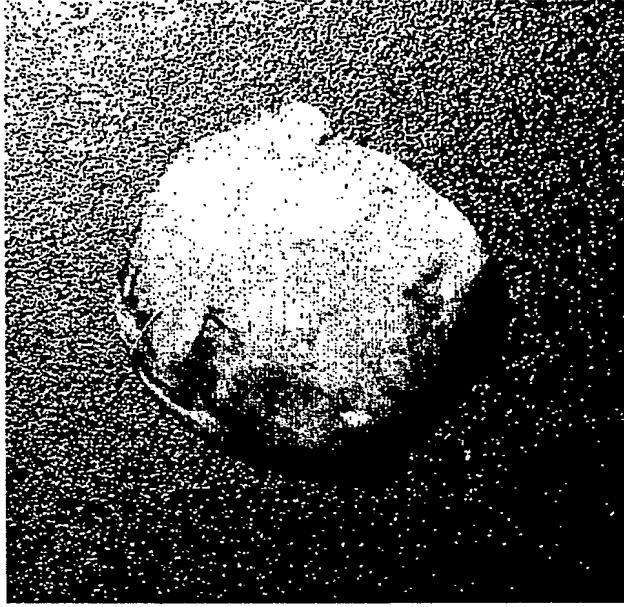
図10 MMP-2及びMT1-MMP mRNAの発現に関する解析



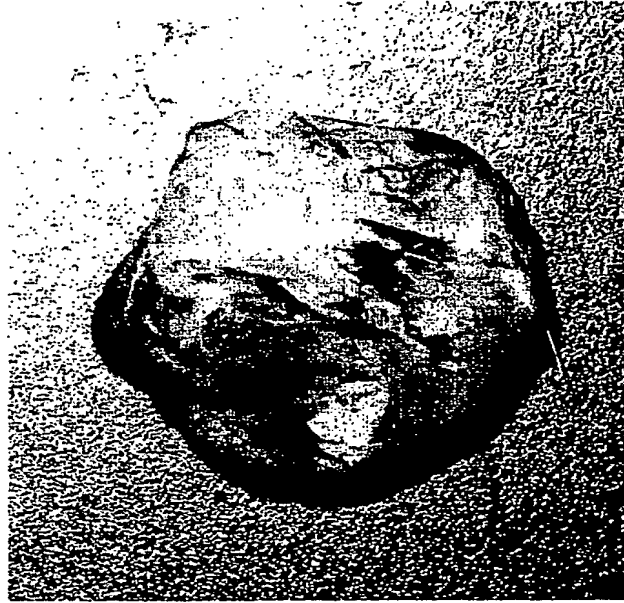
【図 11】

図 11 FGF-2誘発肉芽形成モデルにおけるin vivo血管新生阻害作用の解析

B FGF-2/ChM1L

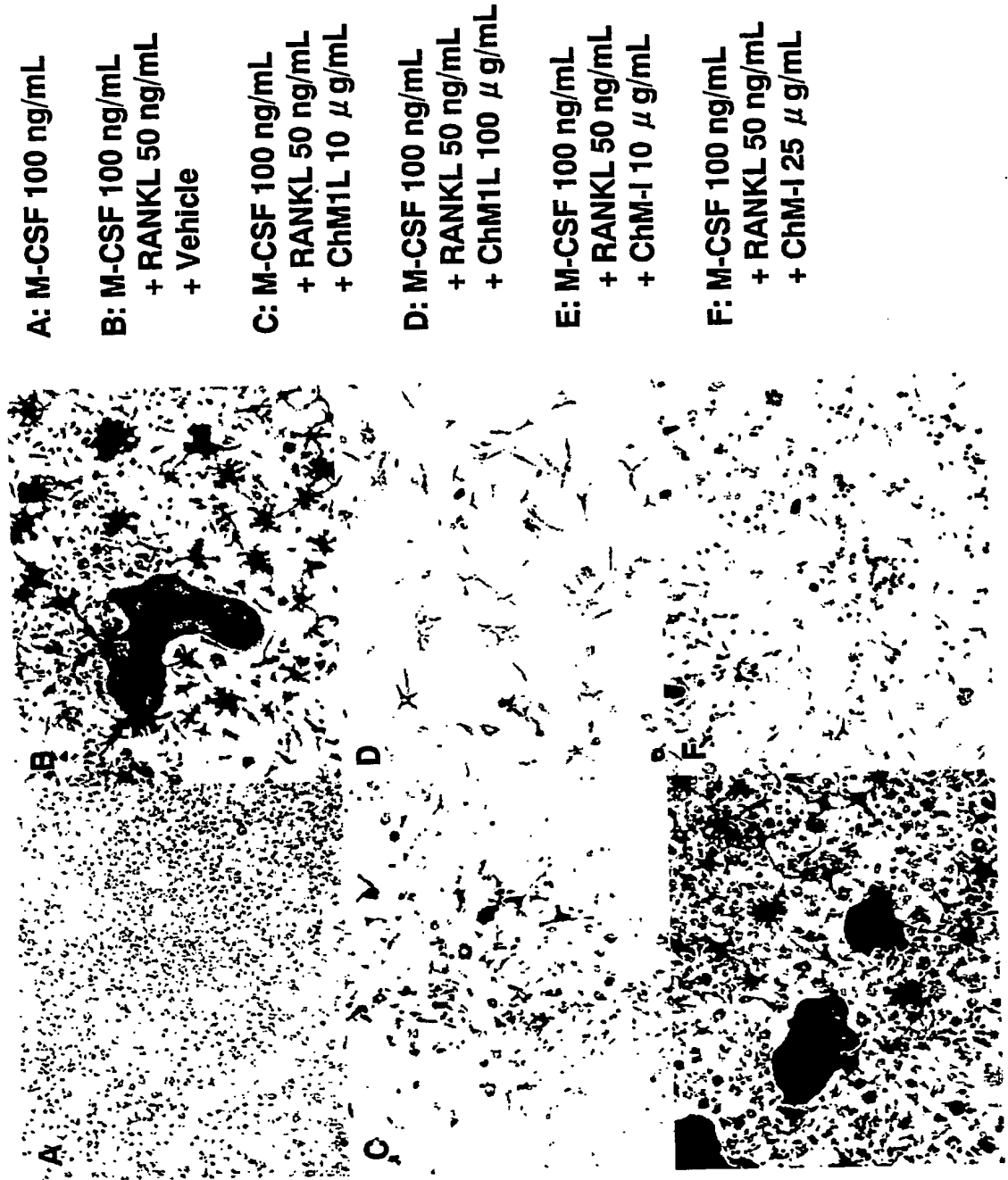


A FGF-2/HEPES



【図12】

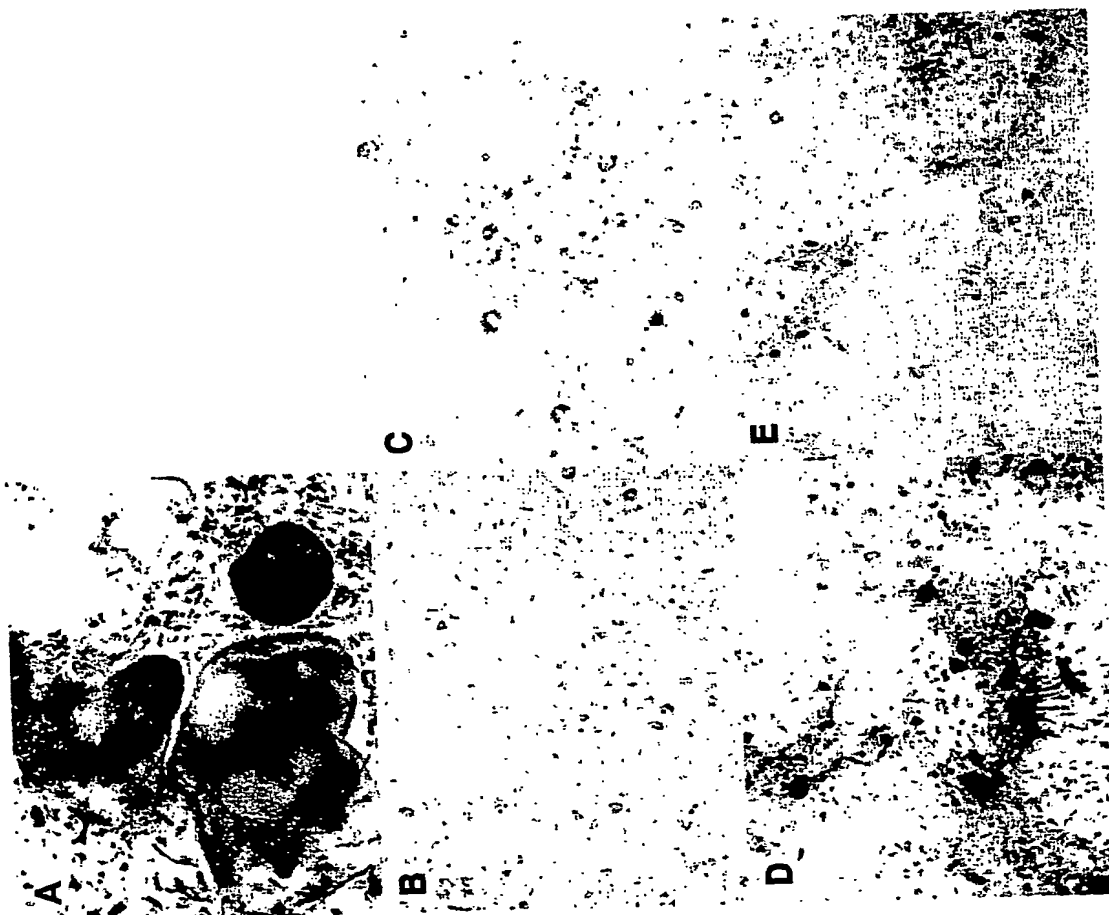
図12 破骨細胞形成抑制作用の解析
(M-CSF依存的な骨髄マクロファージを用いた検討)



【図13】

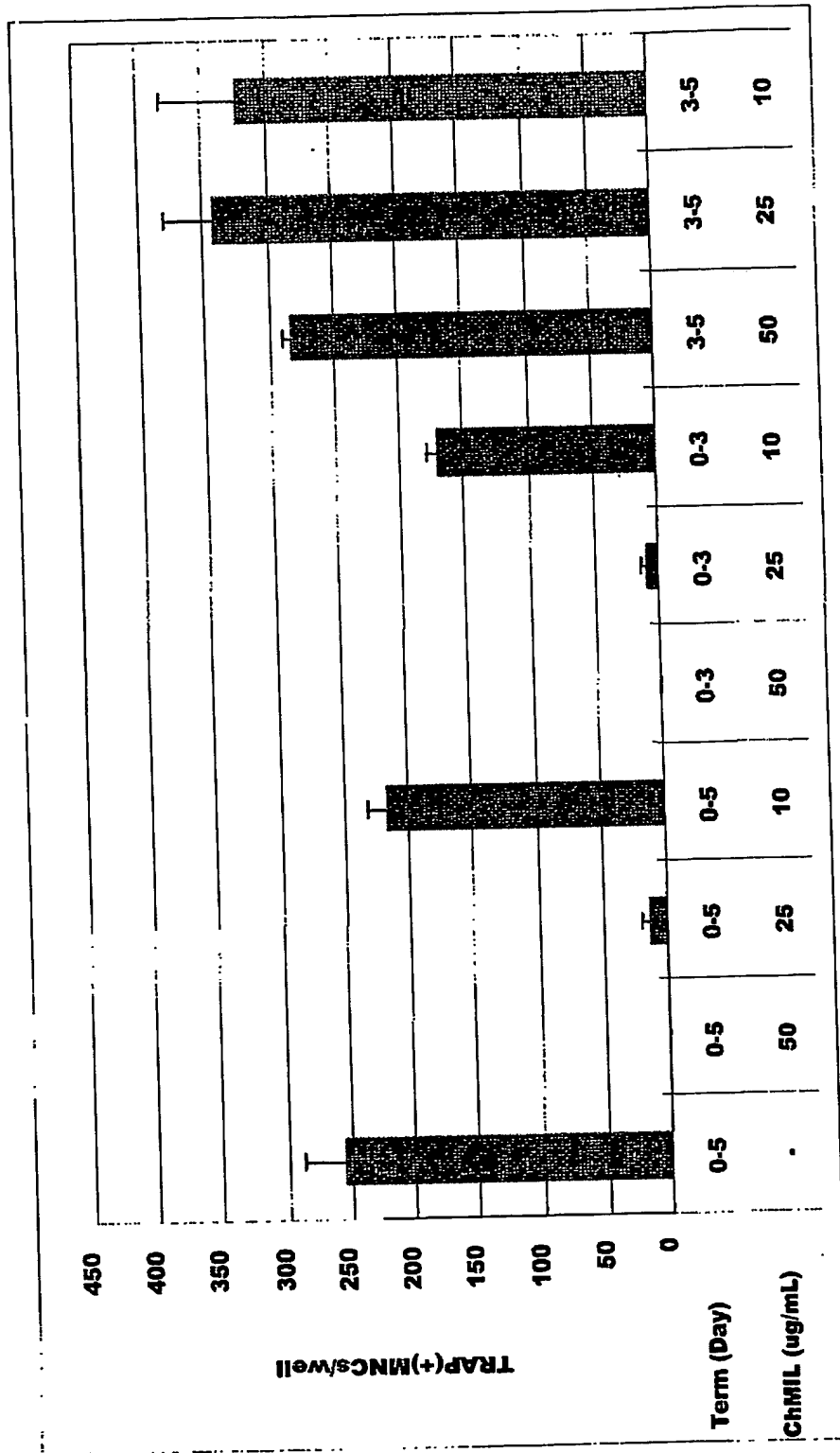
図13 破骨細胞形成抑制作用の解析
(骨髓細胞培養系を用いた検討)

- A: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-8} M)
+ Vehicle
- B: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-8} M)
+ ChM1L 10 $\mu\text{g/mL}$
- C: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-8} M)
+ ChM1L 100 $\mu\text{g/mL}$
- D: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-8} M)
+ ChM-I 10 $\mu\text{g/mL}$
- E: $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (10^{-8} M)
+ ChM-I 25 $\mu\text{g/mL}$

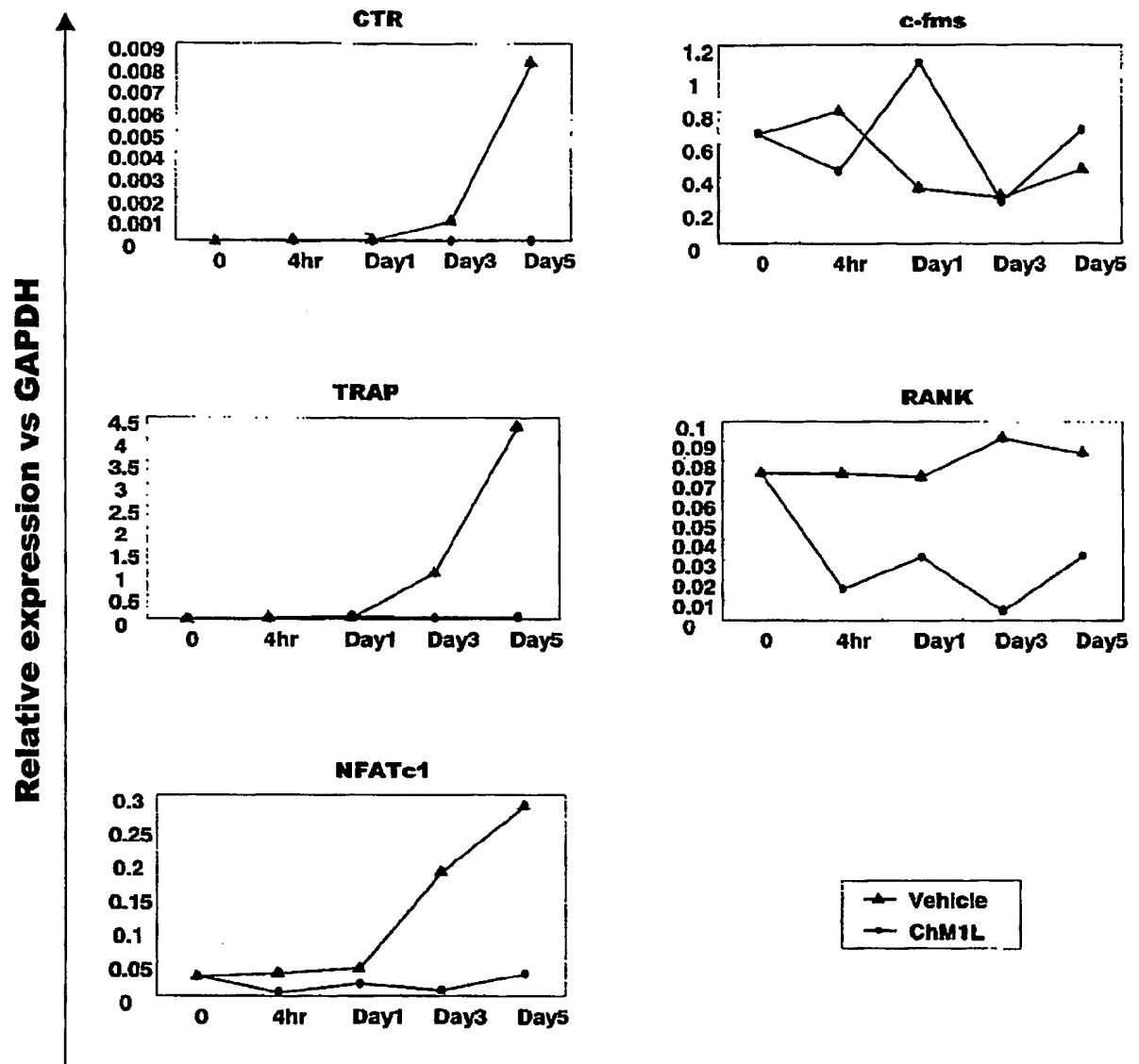


【図14】

図14 破骨細胞形成抑制作用のメカニズム解析

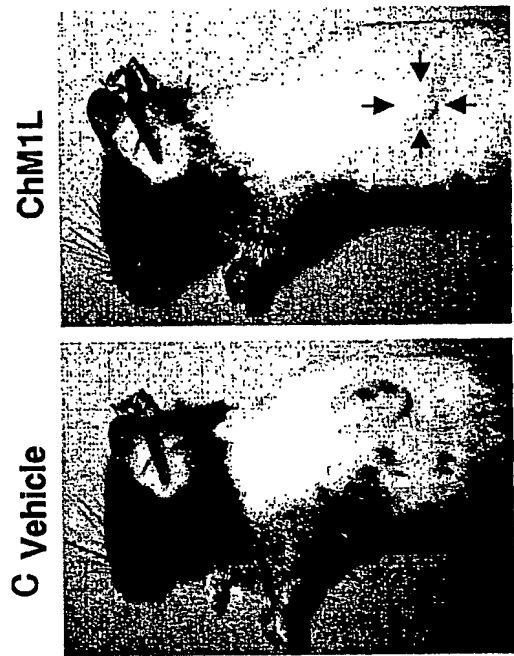
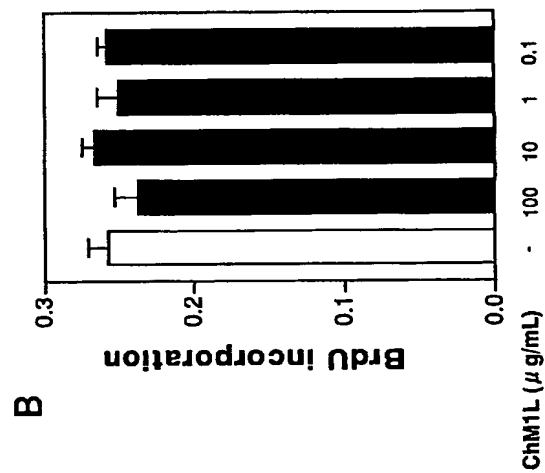
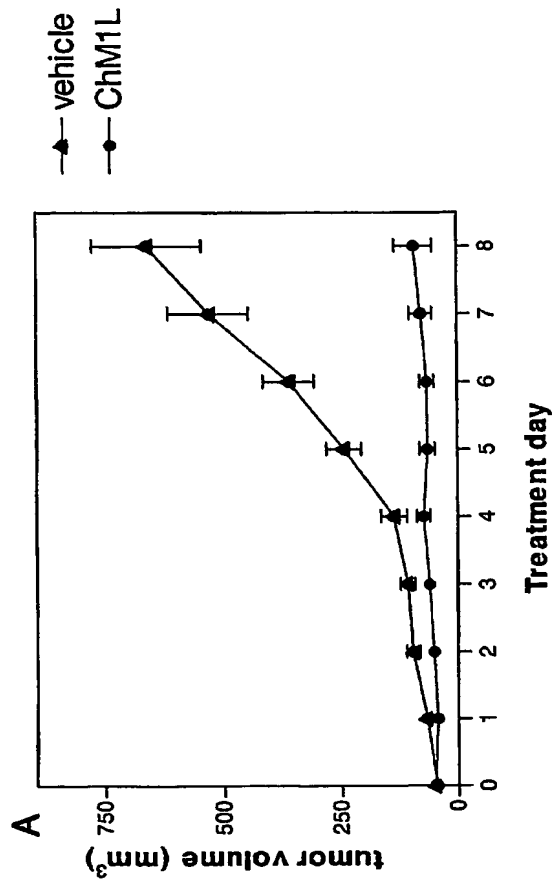


【図15】



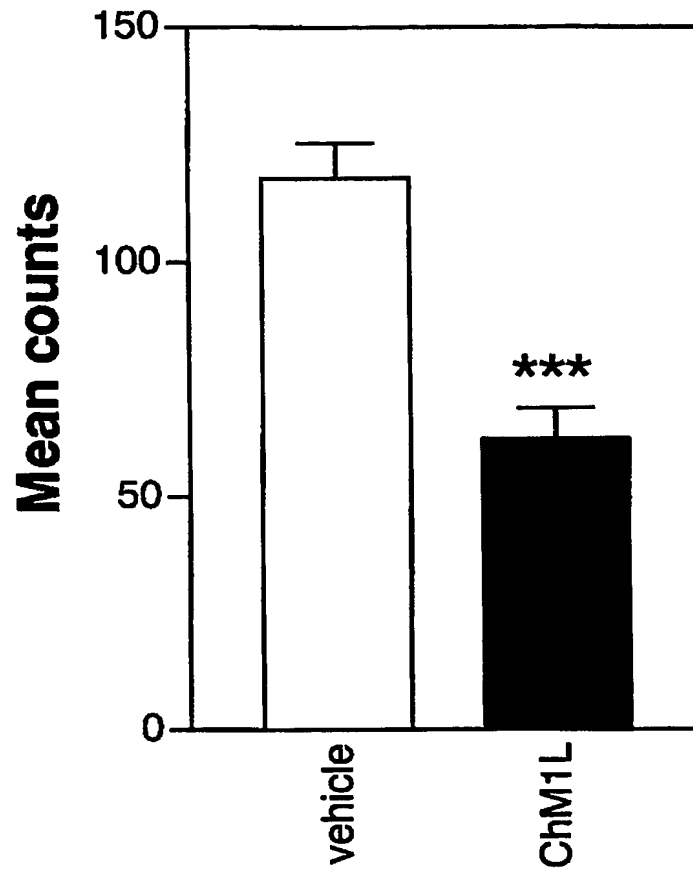
【図 16】

図16 ChM1L投与によるB16F10メラノーマの増殖抑制



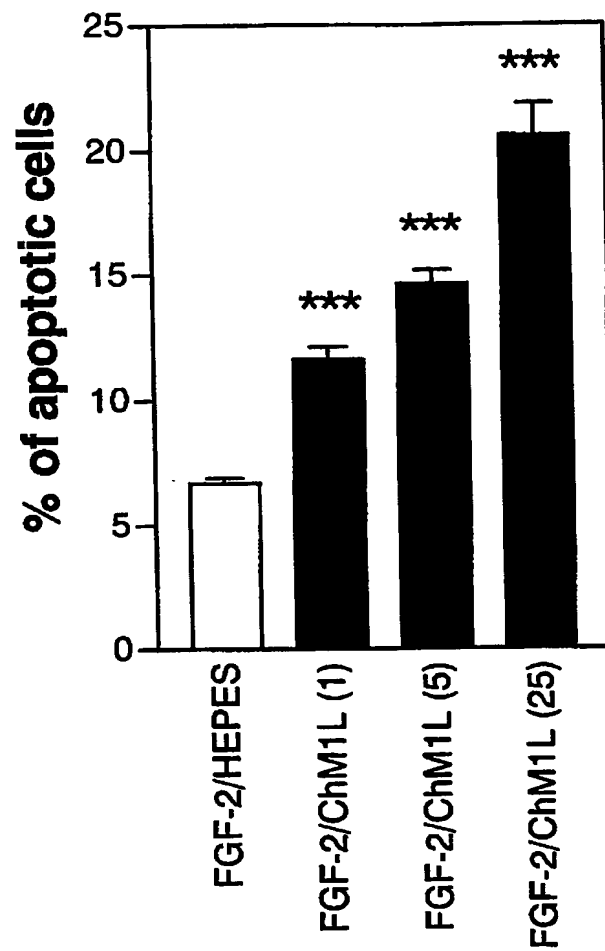
【図17】

図17 ChM1L投与によるB16F10メラノーマの肺転移抑制



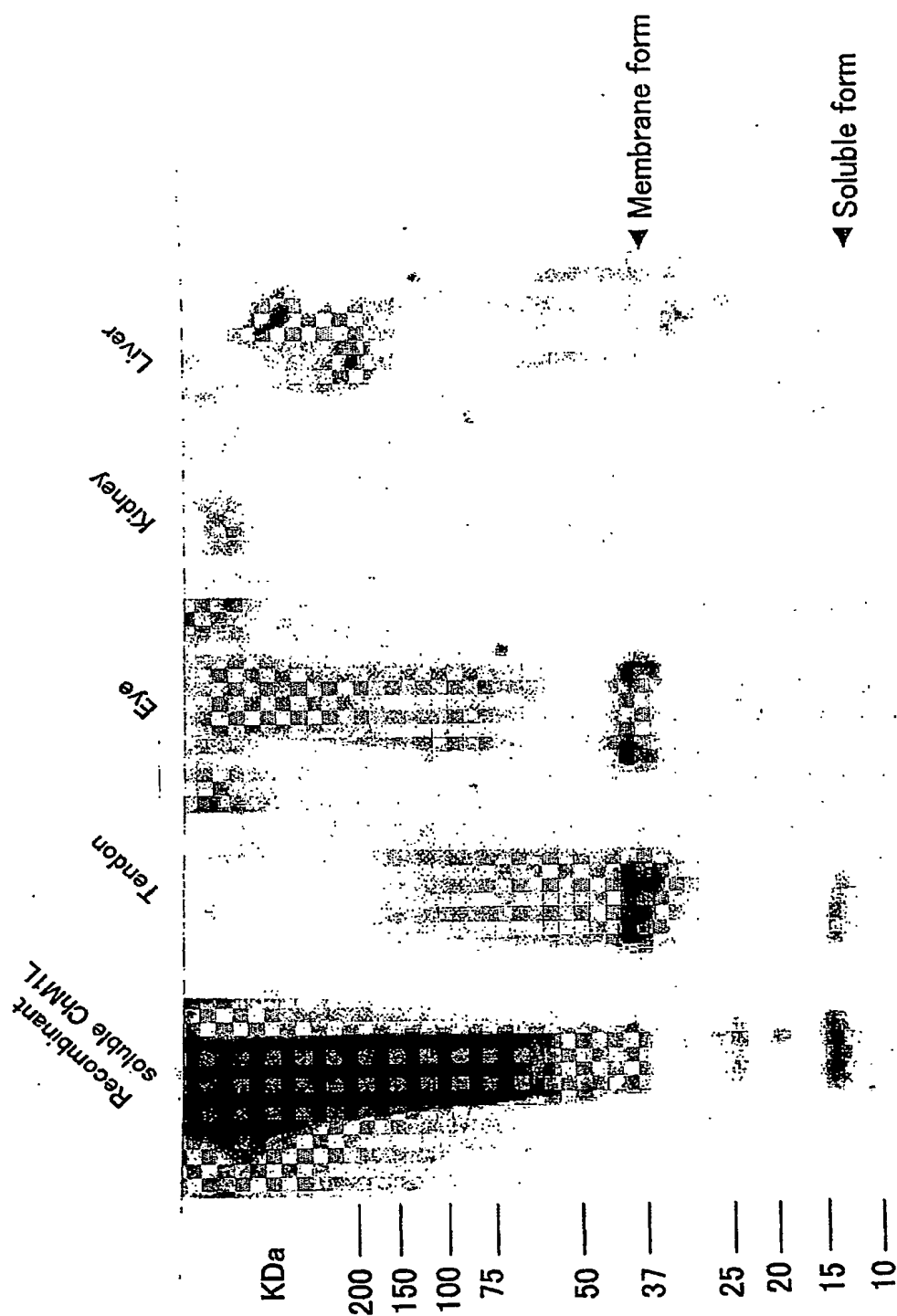
【図 18】

図 18 ChM1Lの血管内皮細胞におけるアポトーシス誘導



【図 19】

図19 生体組織における可溶性ChM1Lの検出



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規構造を持つ血管新生抑制活性もしくは破骨細胞形成抑制活性を有するポリペプチド、そのペプチドの精製方法を構築して、組換えタンパク質を提供する。また、それによって腱炎、関節リウマチ、変形性関節症、悪性腫瘍等の疾患の治療薬創生に有用な成分を提供する。

【解決手段】 新規の分泌型ChM1Lタンパク質。

【選択図】 なし

特願 2 0 0 4 - 1 4 3 4 2 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[5 0 3 3 6 9 4 9 5]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都千代田区内幸町二丁目 1 番 1 号

氏 名

帝人ファーマ株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☒ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.